Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 17, No. 2, Summer. 2019, p. 221-240

نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد 17، شماره 2، تابستان 1398، ص. 240-221

تعیین محتوی کلروفیل و وضعیت نیتروژن در ژنوتیپ‌های گندم (*Triticum aestivum* L.) دیم با استفاده از کلروفیل‌متر (SPAD)

ولی فیضی اصل[1*]، امیر فتوت[2]، علیرضا آستارایی[3]، امیر لکزیان[4]، جعفر جعفرزاده[5]

تاریخ دریافت: 1396/09/04
تاریخ پذیرش: 1397/08/22

چکیده

امروزه تشخیص گیاه مبنا یکی از مهم‌ترین روش‌های تعیین وضعیت نیتروژن در گیاه می‌باشد. به‌منظور برقراری ارتباط بین داده‌های حاصل از کلروفیل‌متر و وضعیت نیتروژن در ژنوتیپ‌های گندم دیم در مدیریت‌های مختلف مصرف نیتروژن به‌عنوان ابزاری جهت دستیابی به عملکردهای مطلوب، آزمایشی به‌صورت کرت‌های دوبارخردشده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در سال زراعی 90-1389 در مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم مراغه به‌اجرا درآمد. آزمایش شامل زمان مصرف نیتروژن (کل نیتروژن مصرفی در پاییز و مصرف تقسیطی آن به‌صورت $\frac{2}{3}$ در پاییز و $\frac{1}{3}$ در بهار در مرحله ZGS32) به‌عنوان عامل اصلی، چهار سطح نیتروژن (صفر، 30، 60 و 90 کیلوگرم نیتروژن در هکتار) به‌عنوان عامل فرعی اول و 7 ژنوتیپ گندم دیم به‌عنوان عامل فرعی دوم بود. در مراحل شروع پنجه (GS22)، پنجه کامل (GS29)، طویل شدن ساقه (GS32)، ظهور برگ پرچم (GS39) و گلدهی (GS60)، شاخص نسبی کلروفیل با استفاده از دستگاه SPAD قرائت و با اجزای کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل c و کاراتنوئیدهای اندازه‌گیری شده در شرایط آزمایشگاهی برازش داده شد. نتایج نشان داد، شاخص کلروفیل همبستگی مثبت و معنی‌داری با کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل c و کاراتنوئیدها داشت. مصرف تقسیطی نیتروژن توانست شاخص کلروفیل (8/3 درصد) و اجزای کلروفیل (کلروفیل کل، a، b و c به‌ترتیب 15/0، 11/1، 10/9 و 27/0 درصد) و پروتئین دانه (8/5 درصد) را به استثنای کاراتنوئیدها به‌طور معنی‌داری افزایش دهد. مصرف نیتروژن توانست تمامی شاخص‌های کلروفیل را در گیاه تحت تاثیر قرار داده و به‌طور معنی‌داری آنها را تغییر دهد. ایده‌آل‌ترین شرایط از لحاظ شاخص‌های کلروفیل در گیاه با مصرف 72 کیلوگرم نیتروژن در هکتار به‌دست آمد. ژنوتیپ 1 مطلوب‌ترین و آذر 2 نامناسب‌ترین وضعیت را از لحاظ شاخص‌های کلروفیل و نسبت کلروفیل کل به کاراتنوئیدها (مطلوب 70-40) در گیاه به‌عنوان شاخص مقاومت به تنش به خود اختصاص دادند.

واژه‌های کلیدی: اجزای کلروفیل، تنش رطوبتی، روش بای پلات، مراحل رشد، مصرف اقتصادی نیتروژن

مقدمه

کمبود نیتروژن بیش از هر عنصر دیگری عامل محدودکننده رشد می‌باشد. این عنصر به مقدار زیادی توسط گیاهان از خاک جذب می‌شود. کمبود نیتروژن به دلیل کمی مواد آلی در مناطق خشک و نیمه‌خشک به‌عنوان منشاء طبیعی نیتروژن مورد نیاز گیاه اتفاق می‌افتد. از سوی دیگر، وجود تنش رطوبتی به‌عنوان مانع اصلی جذب این عنصر باعث می‌شود تا تنش نیتروژنی مهمترین عامل محدودکننده تولید گندم (*Triticum aestivum*) دیم پس از تنش رطوبتی در این مناطق باشد. از این رو، تأمین کافی نیتروژن قابل استفاده در خاک برای رشد بهینه گندم دیم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Feiziasl *et al*., 2014; Feiziasl *et al*., 2016). اگرچه کشاورزان در سرتاسر دنیا عملاً به این نتیجه رسیده‌اند که با مصرف زیاد نیتروژن می‌توان به عملکردهای بیشتری دست یافت اما مصرف بیش از حد نیتروژن باعث کاهش عملکرد دانه گندم و تلفات بیشتر نیتروژن می‌شود (Wang *et al*., 2011).

امروزه با پیشرفت تکنیک سنجش از راه دور، برخی برای توصیه کودهای نیتروژنی از تشخیص‌های گیاه مبنایی[6] مانند شاخص نسبی کلروفیل (Follet *et al*., 1992)، شاخص نرمال شده پوشش

1- استادیار موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مراغه، ایران
2- استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
3- دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
4- استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
5- استادیار موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مراغه، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: vfeiziasl@yahoo.com)
DOI: 10.22067/gsc.v17i2.68973

6- Plant-based diagnosis

گیاهی[1] (NDVI) و غیره را در مقابل واسنجی نیتروژن در خاکرخ با پاسخ گیاه مناسب‌تر و کم هزینه‌تر می‌دانند (Limon-Ortega, 2009). با این حال، برای تأیید صحت و دقت اغلب این روش‌ها از واسنجی آنها با مقادیر نیتروژن معدنی خاک و نیتروژن جذب شده توسط گیاه استفاده می‌شود. برای مدیریت کوددهی نیتروژن، ارزیابی وضعیت نیتروژن گیاه در طول دوره رشد مهم است. امروزه استفاده از کلروفیل‌متر[2] (SPAD) یکی از راهکارهای مفید برای پی بردن به وضعیت نیتروژن و شدت فتوسنتز گیاه از طریق تخمین میزان کلروفیل آن است، زیرا نزدیک به 75 درصد نیتروژن جذب شده در گیاه در ساختمان کلرفیل و آنزیم‌های مرتبط با کلروفیل شرکت دارد (Gianquinto and Bona, 2000; Tilling *et al*., 2007; Esfahani *et al*., 2008). این عمل افزون بر کاهش هزینه‌های کوددهی، باعث افزایش کارایی استفاده از نیتروژن، حفظ محیط‌زیست و جلوگیری از نمونه‌گیری‌های تخریبی روش‌های سنتی در برآورد میزان نیتروژن و کلروفیل گیاه می‌شود (Andraski *et al*., 2000; Gianquinto *et al*., 2003; Hirel *et al*., 2007). زمانی‌که گیاه در معرض تنش نیتروژن قرار گرفته باشد، میزان کلروفیل آن به شدت کاهش می‌یابد که با استفاده از کلروفیل‌متر می‌توان این وضعیت را تشخیص داد. دستگاه SPAD قادر است وضعیت نیتروژن برگ را با تخمین مقدار کلروفیل برگ ارزیابی کند. کار با این دستگاه بسیار سریع و آسان بوده و قرائت در مدت چند ثانیه می‌تواند انجام شود. از آنجا که کلروفیل‌متر میزان سبزینگی گیاه را مورد ارزیابی قرار می‌دهد، از طریق مقایسه عدد آن با قرائت کلروفیل‌متر در گیاهان شاهد کوددهی شده (تیمار مرجع)، می‌توان به محتوای نیتروژن گیاه نیز پی برد. این موضوع به پژوهش‌گر اجازه می‌دهد که عملیات کوددهی به گیاه را بر اساس نیاز واقعی گیاه برنامه‌ریزی نماید و ریسک کاهش عملکرد در اثر کمبود مواد غذایی و همچنین هزینه ناشی ازکوددهی اضافی را کاهش دهد (Arshadi *et al*., 2016).

نتایج ضد و نقیضی در خصوص کاربرد دستگاه SPAD در شناسایی وضعیت نیتروژن در گیاه گزارش شده است، اما اغلب این نتایج گویای رابطه معنی‌دار بین قرائت‌های کلروفیل‌متر با میزان کلروفیل و نیتروژن کل موجود در گیاه می‌باشد. چانجیانگ و همکاران (Chunjiang *et al*., 2007) در آزمایش مزرعه‌ای در چین، همبستگی خطی بین اعداد حاصل از کلروفیل‌متر (SPAD) با نیتروژن در برگ (0/81) و عملکرد دانه (0/85) را در گندم نان گزارش نمودند. مجیدی (Majidi, 2014) گزارش کرد، کلروفیل‌متر توانست به‌طور موفقیت‌آمیزی (63 الی 88 درصد) تغییرات غلظت نیتروژن کل را در برگ ارقام مختلف گندم پیش‌بینی نماید، اما این شاخص رابطه معنی‌داری با عملکرد دانه نداشت. صالحی و همکاران (Salehi *et al*., 2004) اعلام داشتند، در شرایط شوری قرائت‌های کلروفیل‌متر توانست 84 درصد از تغییرات نیتروژن کل را در برگ پرچم گندم در مرحله ساقه رفتن و گلدهی توجیه نمایند. اگرچه بین سطوح شوری و نیتروژن برگ همبستگی مثبت و معنی‌داری (88 درصد) مشاهده شد، اما در سطوح بالای شوری (300 میلی مول بر لیتر) تقریباً ارتباطی بین اعداد حاصل از SPAD و نیتروژن گیاه وجود نداشت. در تحقیقات خادمی و اسدی (Khademi and Asadi, 2013)، با وجود همبستگی بین غلظت نیتروژن در گیاه و مقادیر قرائت کلروفیل‌متر، بیشترین همبستگی (85 درصد) در مرحله 7 برگی ذرت (*Zea mays*) مشاهده شد. این در حالی است که در برخی از پژوهش‌های انجام گرفته رابطه معنی‌داری بین شاخص کلروفیل و غلظت نیتروژن گیاه وجود نداشته است. اصفهانی و همکاران (Esfahani *et al*., 2008) به این نتیجه رسیدند که داده‌های به‌دست آمده از SPAD تنها توانست 23 درصد از تغییرات غلظت نیتروژن کل را در مراحل مختلف رشد برنج (*Oryza sativa*) توجیه نماید. لی و همکاران (Li *et al*., 2011) نیز در محصول برنج با ادغام داده‌های حاصل از مراحل مختلف اندازه‌گیری شاخص کلروفیل گزارش کردند که رابطه معنی‌داری (یک درصد) بین داده‌های SPAD و غلظت نیتروژن در برگ به‌دست نیامد.

با توجه به مطالب یادشده، هدف این تحقیق بررسی امکان ارتباط بین اعداد کلروفیل‌متر با نیتروژن کل برگ پرچم ژنوتیپ‌های مختلف گندم دیم و ارزیابی وضعیت نیتروژنی گیاه به‌عنوان ابزاری کمکی برای توصیه کودهای نیتروژنی در شرایط دیم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور واسنجی داده‌های حاصل از کلروفیل‌متر با مقادیر نیتروژن کل در ژنوتیپ‌های مختلف گندم دیم، آزمایشی به‌صورت کرت‌های دوبارخردشده (اسپلیت اسپلیت پلات) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در سال زراعی 90-1389 در مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم مراغه به اجرا درآمد. آزمایش شامل زمان مصرف نیتروژن (کل نیتروژن مصرفی در پاییز و مصرف تقسیطی آن به‌صورت $\frac{2}{3}$ در پاییز و $\frac{1}{3}$ در بهار در مرحله ZGS32) به‌عنوان عامل اصلی، چهار سطح نیتروژن (صفر، 30، 60 و 90 کیلوگرم نیتروژن در هکتار) به‌عنوان عامل فرعی اول و 7 ژنوتیپ گندم دیم (آذر 2، رصد، اوحدی، Genotype1، Genotype 2، Genotype 3 و Genotype 4 به‌ترتیب با شجره SARA-BW-F6-06-85-86-29-1، TEVEE'S'//CROW/VEE'S' -2، DH-2049-3 و HN7/OROFEN//BGN8/3/SERI/4/.. -4 که از این به بعد با شماره‌های 1، 2، 3 و 4 خوانده می‌شوند) به‌عنوان عامل

1- Normalized Difference Vegetation Index (NDVI)
2- Soil Plant Analysis Development (SPAD) or Chlorophyll Content Index (CCI)

فرعی دوم بود. موسسه تحقیقات کشاورزی دیم واقع در 25 کیلومتری جاده مراغه - هشترود در 46 درجه و 20 دقیقه طول شرقی و 37 درجه و 12 دقیقه عرض شمالی و ارتفاع 1720 متری از سطح دریا با اقلیم نیمه‌خشک سرد هم‌مرز با فراسرد دارای سری خاک رجل آباد با مشخصات Fine mixed, Mesic, Verti Calcixereptsv با بافت لوم تا رس سیلتی می‌باشد. بارندگی و آمار هواشناسی در سال زراعی یادشده نزدیک به میانگین بلندمدت ایستگاه بود (جدول 1). از خاک محل اجرای آزمایش از عمق صفر تا 25 سانتی‌متری به روش مرکب نمونه‌برداری شد. نتایج آزمایش خاک در جدول 2 آمده است.

جدول 1- آمار هواشناسی ایستگاه تحقیقات کشاورزی دیم مراغه در سال زراعی 90- 89 و میانگین بلندمدت (20 ساله)

Table 1- Maragheh dryland agriculture research station climate data in cropping year 2010-2011 and long term (20 years)

سال Year	بارندگی Rainfall (mm)	میانگین دمای کمینه Mean Min. Temperature (°C)	میانگین دمای حداکثر Mean Max. Temperature (°C)	میانگین دما Mean Temperature (°C)	تعداد روزهای زیر صفر درجه سانتی‌گراد Days of below zero °C	رطوبت نسبی هوا Relative humidity (%)	تبخیر Evaporation (mm)
2010-2011	353	2.5	16.5	8.7	130	50.3	1485
1992-2012	365	4.2	14.6	9.4	128	53.0	1757

جدول 2- ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی خاک قبل از کاشت (عمق 25-0 سانتی‌متری)

Table 2- Soil physical and chemical characteristics before sowing (0-25 cm depth)

شن Sand (%)	سیلت Silt (%)	رس Clay (%)	کربنات کلسیم معادل $CaCO_3$ (%)	کربن آلی OC (%)	درصد اشباع SP (%)	واکنش خاک pH	هدایت الکتریکی EC (dS m^{-1})
25	40	35	5.1	0.72	47	7.7	0.15
نیترات NO_3^- (mg kg^{-1})	آمونیوم NH_4^+ (mg kg^{-1})	فسفر P (mg kg^{-1})	پتاسیم K (mg kg^{-1})	آهن Fe (mg kg^{-1})	منگنز Mn (mg kg^{-1})	روی Zn (mg kg^{-1})	مس Cu (mg kg^{-1})
7.2	4.6	5.8	677	7.6	13.6	1.1	2.3

فسفر بر اساس حد بحرانی 10 میلی‌گرم در کیلوگرم (Feiziasl *et al.*, 2004) به میزان 65 کیلوگرم در هکتار از منبع سوپر فسفات تریپل و به‌صورت جای‌گذاری هم‌زمان با کاشت مصرف گردید. با توجه به بالا بودن میزان پتاسیم و عناصر کم‌مصرف آهن، منگنز، روی و مس قابل استفاده در خاک (جدول 2) از حد بحرانی ارائه شده برای این عناصر (پتاسیم 250، آهن 9، منگنز 11، روی 1 و مس 1/8 میلی‌گرم در کیلوگرم)، نیاز به مصرف کودهای پتاسیمی و عناصر کم‌مصرف نشد (Feiziasl *et al.*, 2009; Malakouti and Gheibi, 2000).

مقادیر نیتروژن کرت‌ها در مصرف پاییزی با استفاده از دستگاه کاشت هاسیا از منبع اوره هم‌زمان با کاشت در عمق 7-5 سانتی‌متری زیر بستر بذر جای‌گذاری شد. بذرهای گندم با تراکم 400 دانه در مترمربع پس از ضدعفونی با قارچ‌کش کاربوکسین‌تیرام به نسبت دو در هزار و به کمک بذرکار آزمایشی (وینتراشتایگر) در عمق 7-5 سانتی‌متری در دهه اول مهر ماه کشت شد.

در مراحل شروع پنجه (GS22)، پنجه کامل (GS29)، طویل شدن ساقه (GS32)، ظهور برگ پرچم (GS39) و گلدهی (GS60)، شاخص نسبی کلروفیل با استفاده از دستگاه SPAD قرائت و به‌منظور برازش و تبدیل اعداد به‌دست آمده از کلروفیل‌متر (SPAD-Hansatech مدل Cl-01) با میزان واقعی کلروفیل و اجزای آن در گیاه در مرحله گلدهی (GS60)، برگ‌هایی که توسط کلروفیل‌متر قرائت شد (میانگین تعداد قرائت در 30 کرت در سطوح مختلف نیتروژن) بلافاصله از گیاه جدا و در داخل کیسه‌های پلاستیکی به محفظه حاوی یخ منتقل شدند. برای استخراج کلروفیل برگ‌ها در آزمایشگاه از روش آرنون (Arnon, 1949) استفاده شد. مقدار یک گرم وزن تر برگ با ترازوی 0/0001 گرم توزین و در 10 میلی‌لیتر استن 80 درصد با هاون در داخل بوته چینی ساییده و پس از صاف کردن با کاغذ واتمن شماره 2، بخش باقی‌مانده برگ بر روی بوته چینی و کاغذ صافی مجدداً با استفاده از 10 میلی‌لیتر استن 80 درصد به‌طور کامل ساییده و حجم نهایی عصاره صاف شده با استن 80 درصد به 20 میلی‌لیتر رسانده شد. مقدار جذب نور در طول موج‌های A_{470}، A_{647} و A_{663} نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت و برای تنظیم دستگاه از استن 80 درصد به‌عنوان شاهد استفاده شد. غلظت کلروفیل‌های a، b، c، کل و کاروتنوئیدها بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌ترتیب از طریق روابط 1، 2، 3، 4 و 5 تعیین گردید (Humphrey and Jeffrey, 1975; Lichtenthaler *et al.*, 2001):

$$Chl.a=(12.25\times A_{663}-2.97\times A_{647}) \quad (1)$$

$$Chl.b=(21.51\times A_{647}-5.10\times A_{663}) \quad (2)$$

$$Chl.c=(24.36\times A_{630}-3.73\times A_{664}) \quad (3)$$

$$Chl.Total=(Chl.a+Chl.b) \quad (4)$$

$$C_{X+C}=\left[(1000\times A_{470})-(1.8\times Chl.a)-(85.02\times Chl.b)\right]/198 \quad (5)$$

در این معادله‌ها:

Chl.a: غلظت کلروفیل a (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)

Chl.b: غلظت کلروفیل b (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)

Chl.c: غلظت کلروفیل c (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)

Chl.Total: غلظت کلروفیل کل (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)

C_{X+C}: غلظت کاروتنوئیدها شامل کاروتن‌ها و گزانتوفیل‌ها (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)

A_{470}، A_{647} و A_{663}: به‌ترتیب جذب نور در طول موج‌های 663، 647 و 470 نانومتر می‌باشد.

شاخص نیتروژن (NI) برای تیمارهای آزمایشی با استفاده از معادله 6 محاسبه گردید (Gianquinto and Bona, 2000; Arshadi and Asgharipour, 2011):

$$NI = \frac{SPAD\ chl.each\ plot}{SPAD\ chl.control\ plot} \times 100 \quad (6)$$

در این رابطه:

NI: شاخص نیتروژن

SPAD chl.each plot: قرائت کلروفیل‌متر در تیمارهای نیتروژنی

SPAD chl.control plot: قرائت کلروفیل‌متر در تیمار شاهد (بدون مصرف نیتروژن) می‌باشد.

همچنین شاخص دیگری را تحت عنوان شاخص کفایت کلروفیل[1] (CSI) یا شاخص نسبی کلروفیل‌متر[2] (RCM) که همبستگی مثبت و معنی‌داری با عملکرد گیاهان و میزان نیتروژن گیاه دارد، برای تیمارهای آزمایشی از طریق معادله 7 محاسبه شد (Peterson *et al*., 1993):

$$RCM = \frac{SPAD\ chl.each\ plot}{SPAD\ chl.refrence\ plot} \times 100 \quad (7)$$

در این رابطه:

RCM : شاخص کفایت کلروفیل

SPAD chl.each plot: قرائت کلروفیل‌متر در تیمارهای نیتروژنی (شرایط تغذیه نیتروژنی غیرنرمال)

SPAD chl.refrence plot: قرائت کلروفیل‌متر در تیمار مرجع (تغذیه بهینه نیتروژن یا متوسط نیاز نیتروژنی گندم دیم برای دستیابی به حداکثر عملکرد معادل با 60 کیلوگرم در هکتار) است (Feiziasl *et al*., 2014).

پس از تعیین غلظت اجزای کلروفیل در نمونه‌ها، رابطه آنها با مقادیر شاخص کلروفیل دستگاه SPAD واسنجی و مدل خطی بین اجزای کلروفیل و کلروفیل کل با این شاخص تعیین گردید. در نهایت برای تمامی مقادیر قرائت شده دستگاه SPAD در مراحل مختلف رشد، مقادیر کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها از طریق معادلات برازش شده توسط نرم‌افزار Datafit9 محاسبه شد.

حد بهینه اقتصادی مصرف نیتروژن برای دستیابی به حداکثر سود اقتصادی[3] از طریق برازش مناسب‌ترین معادله رگرسیونی بین مقادیر نیتروژن مصرفی با متوسط عملکرد دانه در سه تکرار برای هر ژنوتیپ از طریق بیشترین ضریب تبیین و کمترین خطای استاندارد به کمک نرم افزار Datafit9 تعیین و از معادله 8 نسبت به نیتروژن مشتق‌گیری و نتیجه مساوی با متغیر اقتصادی عمومی[4] قرار داده شد (Feiziasl *et al*., 2014).

$$E_N = \frac{dY}{dN} \quad (8)$$

که در آن:

$\frac{dY}{dN}$= مشتق از معادله عملکرد نسبت به نیتروژن و

E_N= متغیر اقتصادی عمومی برای نیتروژن که از معادله 9 محاسبه گردید:

$$E_N = \frac{C_N(1+R)^t}{V} \quad (9)$$

که در آن:

C_N= قیمت هر کیلوگرم نیتروژن مصرفی به‌صورت کود (ریال)

R= نرخ بهره یا سود بانکی وام اخذ شده برای خرید کود نیتروژن (درصد)

t= تعداد دوره‌های بازپرداخت اقساط وام (سال) و

V= قیمت هر کیلوگرم بذر تولیدی گندم (ریال) می‌باشد.

از طریق حل معادله (8)، حد بهینه اقتصادی نیتروژن برای هر ژنوتیپ به‌صورت جداگانه محاسبه (جدول 5) و سپس تفاوت از حد بهینه اقتصادی مصرف نیتروژن[5] (NRD) برای هر ژنوتیپ تعیین گردید.

پس از برداشت محصول، نیتروژن کل دانه با استفاده از روش کجلدال تعیین و از طریق معادله 10 غلظت پروتئین دانه محاسبه شد (Fowler *et al*., 1989):

$$Seed\ protein\ (\%) = 5.7 \times Total\ Seed\ N \quad (10)$$

برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در سطوح مصرف نیتروژن و تشخیص اینکه برای هر ژنوتیپ کدام سطح مصرف کودی مناسب است، از روش GGE بای‌پلات استفاده شد (Yan, 2001). برای تجزیه واریانس داده‌ها از نرم‌افزار GenStat 14 و مقایسات میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون کمترین اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد. برای تعیین مناسب‌ترین رگرسیون‌ها از نرم‌افزار CurveExpert140 و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

1- Chlorophyll Sufficiency Index (CSI)
2- Relative Chlorophyll Meter (RCM)
3- Maximum economical profit
4- General economic variable
5- Nitrogen Rate Difference (NRD)

نتایج و بحث

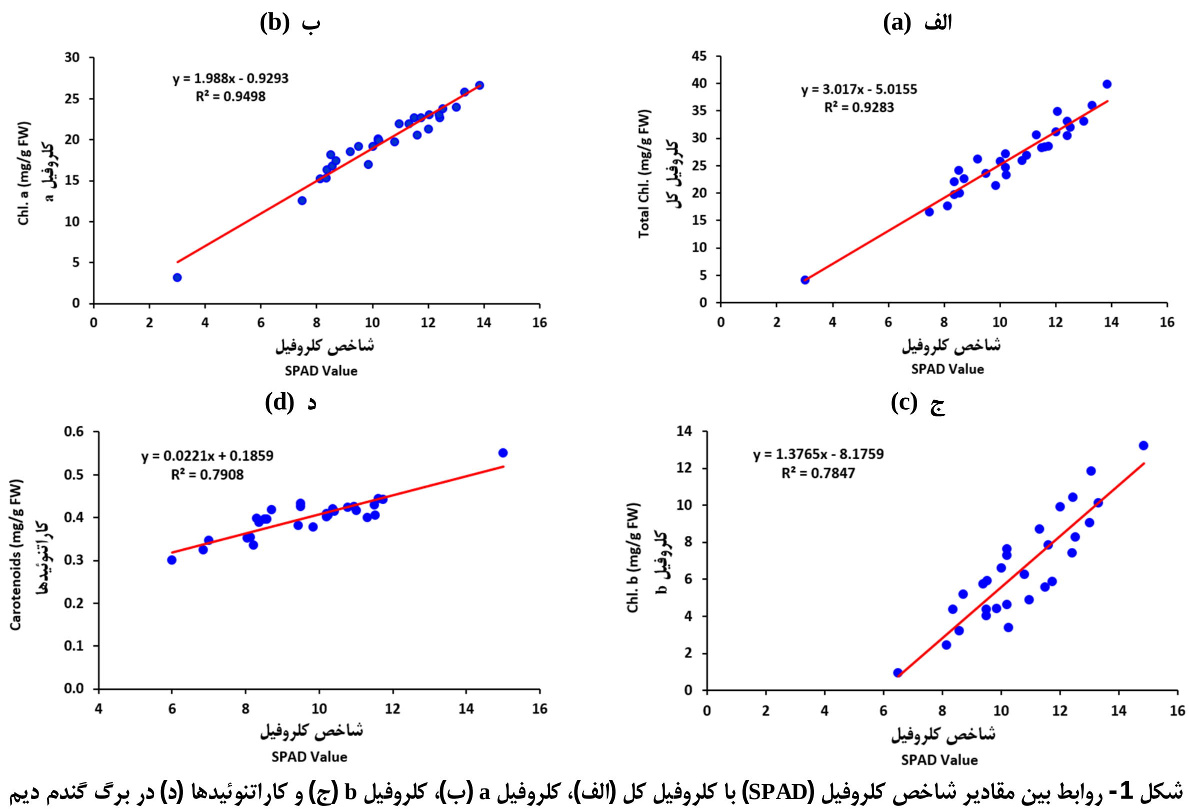
ابتدا داده‌های اندازه‌گیری شده شاخص کلروفیل (SPAD) گندم دیم در مرحله گلدهی (GS60) در مزرعه با اجزای کلروفیل اندازه‌گیری شده در شرایط آزمایشگاهی برای همین مرحله برازش داده شد. تمامی معادلات برازش شده از نوع خطی افزایشی و معنی‌دار بودند. تغییرات شاخص کلروفیل (SPAD) در شرایط مزرعه‌ای توانست تغییرات کلروفیل کل (شکل 1الف)، کلروفیل a (شکل 1ب)، کلروفیلb (شکل 1ج) و کاراتنوئیدها (شکل 1د) را به‌ترتیب 93، 95، 79 و 79 درصد توجیه نماید. سپس با استفاده از معادلات برازش داده شده، مقادیر شاخص کلروفیل (SPAD) قرائت شده در تمامی مراحل رشد گیاه به اجزای مختلف کلروفیل تبدل و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت (جدول 3)، زیرا که در گیاهان مختلف مانند گندم (Peltonen *et al*., 1995)، جو (*Hordeum vulgare*) (Wienhold and Krupinsky, 1999)، برنج (Peng *et al*., 1993) و ذرت (Schepers *et al*., 1992) همبستگی مثبت و معنی‌داری بین شاخص کلروفیل (SPAD) با کلروفیل گیاه و میزان نیتروژن کل در برگ به اثبات رسیده است. بابر و همکاران (Babar *et al*., 2006) وجود همبستگی بسیار قوی بین شاخص کلروفیل (SPAD) و اجزای مختلف کلروفیل a (0/73)، کلروفیل b (0/74) و کلروفیل c (0/72) و همچنین شاخص کلروفیل و زیست‌توده (0/64) را در گندم گزارش نمودند. رفیق الاسلام و همکاران (Rafiqul Islam *et al*., 2014) نیز همبستگی مثبت و قوی (0/99-0/85) را بین شاخص کلروفیل (SPAD) در مراحل مختلف رشد با عملکرد دانه گندم تأیید کردند. شاه و همکاران (Shah *et al*., 2017) بین شاخص کلروفیل و کلروفیل کل (0/93) و کاراتنوئیدها (0/85) همبستگی مثبت و معنی‌داری را در گندم نان گزارش کردند. برخی از پژوهش‌گران مانند یاموتو و همکاران (Yamamoto *et al*., 2002) این معادلات را در گیاهان لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) و سورگوم (*Sorghum bicolor*) خطی با ضریب تبیین به‌ترتیب 0/75 و 0/88 به‌دست آوردند. این در حالی است که کوست و همکاران (Coste *et al*., 2010) در درختان مناطق حاره‌ای این روابط را نمایی با ضریب تبیین 0/89 گزارش کرده‌اند. بریتو و همکاران (Brito *et al*., 2011) نیز معادلات برازش داده شده را بین شاخص کلروفیل (SPAD) و اجزای کلروفیل در گیاه پنبه (*Gossypium barbadense*) از نوع غیر خطی (درجه دوم) با ضریب تبیین 0/73 تا 0/91 به‌دست آورده‌اند. ریچاردسون و همکاران (Richardson *et al*., 2002) نتیجه مشابهی را برای گیاه فلفل (*Capsicum annuum*) گزارش کردند. بنابراین اگرچه در پژوهش‌های مختلف روابط خطی و یا غیرخطی بر حسب نوع گیاه، خاک و شرایط اقلیمی بین شاخص کلروفیل (SPAD) و اجزای مختلف کلروفیل در گیاهان زراعی، باغی و درختان غیرمثمره مطرح شده است، اما تمامی این پژوهش‌ها وجود ارتباط قوی بین آنها را مشابه با نتایج پژوهش حاضر مورد تأیید قرار می‌دهند.

نتایج تجزیه واریانس اجزا و پارامترهای مربوط به کلروفیل در گیاه نشان داد، اثر زمان مصرف پاییزی و تقسیطی نیتروژن بر شاخص کلروفیل (SPAD) در سطح احتمال یک درصد و بر کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل c و کلروفیل کل در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. اثر نیتروژن بر تمامی پارامترها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. اثر ژنوتیپ بر شاخص کلروفیل (SPAD)، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کاراتنوئیدها، کلروفیل c و نسبت کلروفیل a به کلروفیل b در سطح احتمال یک درصد و شاخص نسبی کلروفیل (RCM) در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول 3). اثر متقابل زمان مصرف نیتروژن در ژنوتیپ و نیتروژن در ژنوتیپ تنها بر صفت شاخص نیتروژن (NI) به‌ترتیب در سطح احتمال پنح و یک درصد معنی‌دار بود. اثر مرحله رشد و اثر متقابل مرحله رشد در نیتروژن همانند اثر نیتروژن بر تمامی پارامترها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. اثر متقابل زمان مصرف نیتروژن در مرحله رشد بر دو پارامتر شاخص نسبی کلروفیل (RCM) و شاخص نیتروژن در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. اثرات سه‌جانبه مرحله رشد در زمان مصرف نیتروژن در نیتروژن بر پارامترهای شاخص کلروفیل (SPAD)، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و نسبت کلروفیل a به کلروفیل b در سطح احتمال پنج درصد و بر کاراتنوئیدها و شاخص نیتروژن در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. اثر سه‌جانبه مرحله رشد در زمان مصرف نیتروژن در ژنوتیپ تنها بر شاخص نسبی کلروفیل (RCM) در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول 3).

شاخص کلروفیل (SPAD) در مصرف تقسیطی نیتروژن به‌طور معنی‌داری در مقایسه با مصرف پاییزی افزایش یافت. چنین وضعیتی برای کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کلروفیل c در سطح احتمال پنج درصد وجود داشت. بنابراین مصرف تقسیطی نیتروژن توانسته است محتوی کلروفیل و اجزای آن را در گندم دیم افزایش دهد (جدول 4). با توجه به این‌که نزدیک به 75 درصد از نیتروژن جذب شده در گیاه در ساختمان کلروفیل شرکت دارد و ارتباط مثبت و معنی‌دار بین غلظت نیتروژن در برگ با کلروفیل برگ به اثبات رسیده است (Ma *et al*., 1995; Feibo *et al*., 1998; Junior *et al*., 2010)، لذا منطقی است با مصرف بخشی از نیتروژن در مرحله پنجه‌زنی، شاخص کلروفیل (SPAD) و کلروفیل a، b و c در گیاه افزایش یابد. موسوی و همکاران (Mousavi *et al*., 2012) روش‌های مصرف کود نیتروژنی را بر گندم دیم رقم سرداری در شرایط لرستان مورد بررسی قرار دادند. آنها گزارش کردند، اگرچه مصرف کود پایه در پاییز همزمان با کاشت در مقایسه با بدون مصرف کود پایه و مصرف نواری آن اثر مثبتی در کلروفیل برگ و

شاخص‌های رشد داشت، اما مصرف یک مرتبه نیتروژن به‌صورت سرک در مرحله پنجه‌زنی (به همراه کود پایه) در مقایسه با تقسیط بیشتر آن در مراحل مختلف رشد گندم دیم باعث افزایش حداکثری شاخص کلروفیل در برگ شد. ترابی و همکاران (Torabi *et al*., 2011) نیز افزایش شاخص کلروفیل را با مصرف نیتروژن تا سطح 75 کیلوگرم در هکتار برای گندم دیم به‌صورت تقسیطی (سرک در مرحله ساقه رفتن) گزارش کرده‌اند. نتایج یادشده در خصوص افزایش شاخص کلروفیل گندم دیم در مصرف تقسیطی نیتروژن با نتایج پژوهش حاضر کاملاً مطابقت دارد.

مصرف تقسیطی نیتروژن باعث افزایش معنی‌دار شاخص نسبی کلروفیل (RCM) در کل آزمایش شد (شکل 2الف)، زیرا که میزان کلروفیل در گیاه به غلظت نیتروژن در آن بستگی دارد و مصرف تقسیطی آن منجر به افزایش نیتروژن در برگ می‌شود. مطابق این نتایج در مصرف بهینه اقتصادی کود نیتروژنی (جدول 5)، حد مطلوب (NRD=0) شاخص نسبی کلروفیل (RCM) در مصرف تقسیطی و پاییزی نیتروژن مطابق روش پیشنهادی ساویر و همکاران (Sawyer *et al*., 2011) به‌ترتیب 1/10 و 0/96 تعیین گردید که این نتایج مطلوب بودن نسبی وضعیت کلروفیل را در گیاه در شرایط مصرف تقسیطی نیتروژن به اثبات می‌رساند (شکل 2الف). همچنین مصرف تقسیطی نیتروژن باعث افزایش معنی‌دار غلظت پروتئین دانه (شکل 2ب) شد و توانست آن را به‌طور متوسط یک واحد بهبود بخشد. که این موضوع در ظاهر می‌تواند برای ارتقاء کیفیت ارقامی که میزان پروتئین پایینی دارند، مفید واقع شود. پژوهش‌گران بر این باورند که کاربرد پاییزی نیتروژن سبب افزایش تعداد پنجه بارور و تعداد سنبله در واحد سطح و به دنبال آن افزایش عملکرد دانه گندم دیم می‌شود، اما کوددهی در مرحله پنجه‌زنی گندم به‌صورت سرک موجب افزایش اندازه دانه و محتوای پروتئین آن می‌شود (Rasmussen *et al*., 1997; Fowler, 2002). معمولاً کاربرد دیر هنگام کودهای نیتروژنی در غلات از طریق افزایش فعالیت آنزیم نیترات ریداکتاز باعث افزایش پروتئین دانه و ویژگی‌های کیفی آن می‌شود (Spiertz *et al*., 1984). این در حالی است که نتایج پژوهش‌های لیمون اورتگا (Limon-Ortega, 2009) نشان داد که کاربرد تقسیطی نیتروژن نتوانست ویژگی‌های کیفی دانه را در گندم افزایش دهد، زیرا نتایج کاربرد پاییزی و یا تقسیطی کودهای نیتروژنی بیشتر به شرایط اقلیمی منطقه بستگی دارد و در اغلب موارد نتایج حاصله غیرقابل پیش‌بینی است (Fowler and Brydon, 1989).



شکل 1- روابط بین مقادیر شاخص کلروفیل (SPAD) با کلروفیل کل (الف)، کلروفیل a (ب)، کلروفیل b (ج) و کاراتنوئیدها (د) در برگ گندم دیم

Figure 1- Relationship between chlorophyll index values (SPAD) with total chlorophyll (a), chlorophyll a (b), chlorophyll b (c) and carotenoids (d) in leaf of dryland wheat

جدول ۳- میانگین مربعات و سطح معنی‌داری پارامترهای کلروفیل در گندم دیم در تیمارهای مورد بررسی

Table 3- Mean squares and significance level for chlorophyll components of dryland wheat leaf in treatments

منابع تغییر S.O.V		درجه آزادی df	Mean squares میانگین مربعات								
			شاخص کلروفیل SPAD	کلروفیل a Chl. a	کلروفیل b Chl. b	کلروفیل کل Total chl.	کاراتنوئیدها Carotenoids	کلروفیل c Chl. c	کلروفیل a/کلروفیل b Chl a/Chl b	شاخص نسبی کلروفیل‌متر RCM	شاخص نیتروژن Nitrogen index
Replication	تکرار	2	11.9ns	63.4 ns	7.45 ns	101.4 ns	0.253 ns	0.0003 ns	0.0387 ns	1.403 ns	89301 ns
Time	زمان	1	120.9**	653.9*	76.86*	1046.7*	0.312 ns	0.0600*	0.0091 ns	1.236 ns	3086 ns
Error a	خطای کرت اصلی	2	2.3	11.9	1.39	19.0	0.114	0.0013	0.0042	0.232	13325
Nitrogen	نیتروژن	3	439.0**	2386.7**	280.51**	3820.3**	2.974**	0.1601**	0.3495**	4.728**	337002**
Time*Nitrogen	زمان × نیتروژن	3	19.5 ns	107.7 ns	12.66 ns	172.4 ns	0.148 ns	0.0102 ns	0.0095 ns	0.360 ns	24629 ns
Error b	خطای کرت فرعی	12	14.7	80.8	9.49	129.3	0.144	0.0040	0.0235	0.214	23372
Genotype	ژنوتیپ	6	64.3**	348.1**	40.92**	557.2**	0.413**	0.0212**	0.0447**	0.120*	880 ns
Time*Genotype	زمان × ژنوتیپ	6	1.4 ns	7.6 ns	0.89 ns	12.2 ns	0.020 ns	0.0026 ns	0.0060 ns	0.074 ns	6763*
Nitrogen*Genotype	نیتروژن × ژنوتیپ	18	4.4 ns	24.3 ns	2.85 ns	38.8 ns	0.041 ns	0.0036 ns	0.0064 ns	0.057 ns	5653**
Time*Nitrogen*Genotype	زمان × نیتروژن × ژنوتیپ	18	3.3 ns	18.3 ns	2.15 ns	29.2 ns	0.025 ns	0.0022 ns	0.0091 ns	0.048 ns	2805 ns
Error c	خطا	96	4.9	26.5	3.11	42.4	0.044	0.0025	0.0064	0.054	2615
Stage	مرحله رشد	4	146.0**	793.3**	93.24**	1269.8**	1.176**	0.0319**	0.1163**	0.613**	115840**
Time*Stage	زمان × مرحله رشد	4	3.6 ns	19.8 ns	2.33 ns	31.7 ns	0.027 ns	0.0024 ns	0.0114 ns	0.735**	145008**
Nitrogen*Stage	مرحله رشد × نیتروژن	12	15.0**	81.7**	9.60**	130.7**	0.098**	0.0064**	0.0243**	0.255**	37471**
Genotype*Stage	مرحله رشد × ژنوتیپ	24	4.5 ns	24.7 ns	2.90 ns	39.6 ns	0.041 ns	0.0022 ns	0.0057 ns	0.241**	3272 ns
Stage* Time*Nitrogen	مرحله رشد × زمان × نیتروژن	12	8.1*	43.2*	5.07*	69.1*	0.118**	0.0018 ns	0.0153*	0.105 ns	64569**
Stage*Time*Genotype	مرحله رشد × زمان × ژنوتیپ	24	2.8 ns	15.3 ns	1.80 ns	24.5 ns	0.018 ns	0.0013 ns	0.0053 ns	0.122*	4539 ns
Stage*Nitrogen* Genotype	مرحله رشد × نیتروژن × ژنوتیپ	72	2.9 ns	15.8 ns	1.86 ns	25.3 ns	0.026 ns	0.0020 ns	0.0047 ns	0.048 ns	1948 ns
Stage*Time*Nitrogen*Genotype	مرحله رشد × زمان × نیتروژن× ژنوتیپ	72	2.3 ns	12.3 ns	1.44 ns	19.6 ns	0.028 ns	0.0016 ns	0.0046 ns	0.033 ns	2196 ns
Error (Sampling)	خطای نمونه‌برداری	448	4.2	22.9	2.69	36.7	0.031	0.0018	0.0071	0.071	5131
CV%	ضریب تغییرات (درصد)		23.4	29.6	28.5	27.7	43.6	58.5	3.0	28.4	47.8

ns, * & **: non-significant and significant at 5% and 1% probability levels respectively.

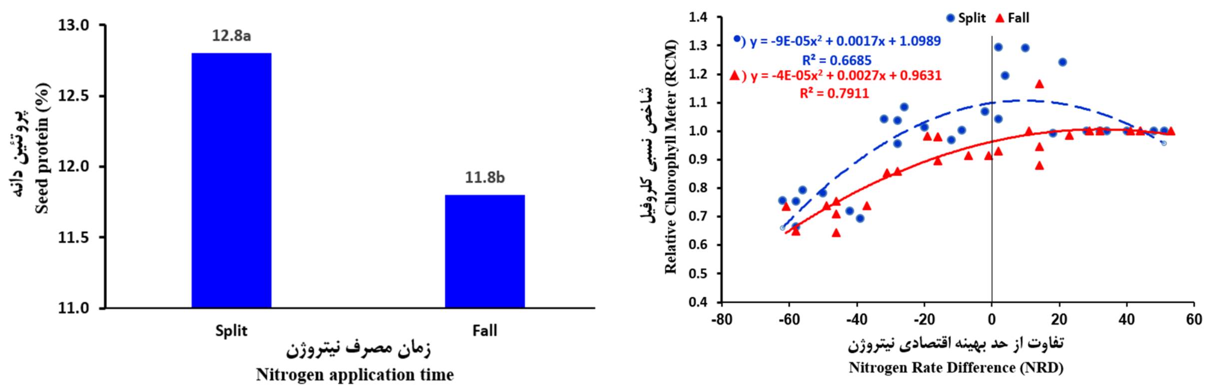
ns، * و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ ٪ و ۱٪

جدول 4- مقایسه میانگین پارامترهای کلروفیل در برگ برای زمان مصرف نیتروژن

Table 4- Mean comparison for chlorophyll components in leaf for nitrogen application time

زمان Time	شاخص کلروفیل SPAD	کلروفیلa Chl. a (mg/g fresh leaf)	کلروفیلb Chl. b (mg/g fresh leaf)	کلروفیل کل Total chl. (mg/g fresh leaf)	کاراتنوئیدها Carotenoids (mg/g fresh leaf)	کلروفیلc Chl. c (mg/g fresh leaf)	کلروفیلa/کلروفیلb Chl a/Chl b	شاخص نسبی کلروفیل‌متر RCM	شاخص نیتروژن Nitrogen index
تقسیطی	9.1	17.0	6.1	23.0	0.39	0.080	2.78	0.98	148
پاییز	8.4	15.3	5.5	20.8	0.43	0.063	2.77	0.90	152
LSD 5%	0.5	1.0	0.4	1.3	0.10	0.011	0.02	0.14	34

(b) ب   الف (a)



شکل 2- رابطه بین تفاوت از حد بهینه اقتصادی نیتروژن (NRD) و شاخص نسبی کلروفیل (RCM) (الف) و محتوی پروتئین دانه در مصرف پاییزی و تقسیطی نیتروژن

Figure 2- Relationship between nitrogen rate difference with relative chlorophyll meter (a) and seed protein content (b) in fall and split nitrogen application

جدول 5- رابطه بین نیتروژن مصرفی با عملکرد دانه و نیاز نیتروژن برای دستیابی به عملکرد حداکثر و اقتصادی در ژنوتیپ‌های مختلف گندم دیم

Table 5- Relationship between nitrogen application rates and grain yield and N requirements for obtaining maximum and economical grain yield in dryland wheat genotypes

ژنوتیپ Genotype	معادله رگرسیون Regression equation	ضریب تبیین (R^2)	خطای (SE)	نیاز نیتروژنی Nitrogen requirement (kg.ha^{-1}): عملکرد حداکثر Max. Yield	حداکثر سود اقتصادی Max. Economical Profit
Azar2 آذر2	Y=-0.342N2+44.48N+1883.9	0.931**	200.4	65	55
Ohadi اوحدی	$Y=-0.230N^2+27.96N+2227.1$	0.997**	313.1	59	50
Rasad رصد	$Y=-0.430N^2+52.89N+1932.6$	0.995**	192.9	61	52
Genotype1 ژنوتیپ1	$Y=-0.276N^2+37.11N+1418.8$	0.807*	181.6	67	57
Genotype2 ژنوتیپ2	$Y=-0.307N^2+42.03N+1525.4$	1.000**	282.0	68	58
Genotype3 ژنوتیپ3	$Y=-0.362N^2+36.81N+1987.9$	0.979**	449.2	50	43
Genotype4 ژنوتیپ4	$Y=-0.393N^2+50.29N+1932.3$	1.000**	1839	63	54

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال 5 ٪ و 1%

* & **: Significant at 5% and 1% probability levels

مصرف نیتروژن توانست تمامی شاخص‌های کلروفیل را در گیاه تحت تاثیر قرار داده و به‌طور معنی‌داری آنها را تغییر دهد. در این خصوص تغییرات کلی تمامی پارامترها به استثنای کارتنوئیدها افزایشی بود (جدول 6). شاخص کلروفیل(SPAD) با افزایش مصرف نیتروژن افزایش یافت، اما دو تیمار N_{60} و N_{90} از این لحاظ در یک کلاس آماری قرار گرفتند. وضعیت کاملاً مشابهی با شاخص کلروفیل (SPAD) از لحاظ تغییرات و گروه‌بندی در پارامترهای کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کلروفیل c نیز مشاهده شد. این در حالی است که در شاخص نسبی کلروفیل (RCM) تیمارهای N_{30}، N_{60} و N_{90} در کلاس برتر A در مقایسه با تیمار شاهد (کلاس B) قرار گرفتند. در شاخص نیتروژن (NI) دو تیمار N_{30} و N_{60} در کلاس مشابه و تیمار N_{90} در برترین کلاس قرار گرفت. همان طوری که

بیان شد، تغییرات میزان کاراتنوئیدها با پارامترهای یادشده عکس بود و مصرف نیتروژن باعث کاهش آن در گیاه شد، اگرچه این کاهش تا آخرین سطح نیتروژن ادامه داشت، اما سه تیمار N_{30}، N_{60} و N_{90} از لحاظ آماری در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول 6). پژوهش‌گران وجود رابطه افزایشی بین میزان نیتروژن مصرفی و کلروفیل را در چمن گینه (*Poa compressa*) (Junior *et al*., 2010)، ذرت (Sawyer *et al*., 2011)، قهوه (*Coffea*) (Reis *et al*., 2009)، برنج (Li *et al*., 2011)، گندم دوروم (*Triticum durum*) (Kızılgeçia *et al*., 2015)، گندم نان (Shah *et al*., 2017) گزارش کرده‌اند. کزیلگچی و همکاران (Kızılgeçia *et al*., 2017) با بررسی اثرات مصرف نیتروژن روی نسل‌های F_2 گندم دوروم در ترکیه گزارش کردند، مصرف نیتروژن توانست به‌طور معنی‌داری شاخص کلروفیل (SPAD) را در مرحله ظهور سنبله در برگ پرچم افزایش دهد. دبیک و همکاران (Debaeke *et al*., 2006) اثرات کاربرد نیتروژن را بر شاخص کلروفیل (SPAD) در گندم دوروم در فرانسه از نوع نمایی تعیین کردند. از سوی دیگر، کارتنوئیدها علاوه بر نقش آنها به‌عنوان گیرنده‌های نوری مکمل، حفاظت ساختار کلروفیل‌ها را در برابر اثرات تخریبی انواع اکسیژن‌های فعال در مراحل اولیه تنش‌های محیطی (رطوبتی و حرارتی) به عهده دارند که با گذشت زمان و در تطابق گیاه با تنش، میزان و نقش آنها نیز کاهش می‌یابد، زیرا آنها می‌توانند اکسیژن یکتایی را غیرفعال و یا به‌وسیله اکسیژن یکتایی اکسید شوند. بنابراین کاراتنوئیدها به‌طور غیرمستقیم تولید گونه‌های اکسیژن را کاهش می‌دهند (Koyro, 2006; Groppa and Benavides, 2008). بر این اساس، در تیمارهای مصرف نیتروژن کاهش مقدار کاراتنوئیدها در مقایسه با تیمار شاهد (N_0) خود می‌تواند دلیل متقنی بر کاهش اثر تنش رطوبتی بر گندم دیم در اثر کاربرد نیتروژن باشد (جدول 6). فیضی اصل (Feiziasl *et al*., 2014) نیز گزارش کردند، مصرف 30، 60 و 90 کیلوگرم نیتروژن در هکتار توانست شدت تنش رطوبتی را به‌ترتیب 55، 88 و 64 درصد در ژنوتیپ‌های مختلف گندم دیم کاهش دهد که این کاهش معادل با افزایش به‌ترتیب 810، 1362 و 942 کیلـوگرم در هکتار عملکرد دانه بود.

بررسی روابط بین پارامترهای کلروفیل در گیاه با میزان نیتروژن مصرفی نشان داد، روابط معنی‌داری بین آنها وجود دارد. به‌طوری که تغییرات نیتروژن مصرفی توانست 98 الی 100 درصد تغییرات این پارامترها را توجیه نماید. به‌استثنای شاخص نیتروژن (NI)، تمامی روابط از نوع درجه دوم بود، با این تفاوت که معادله کاراتنوئیدها از نوع کاهشی و سایر پارامترها از نوع افزایشی بودند. در این میان، تنها رابطه بین شاخص نیتروژن (NI) با میزان نیتروژن مصرفی از نوع خطی افزایشی بود. مطابق این روابط حداکثر مقادیر پارامترهای شاخص کلروفیل (SPAD)، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل c، کلروفیل کل، نسبت کلروفیل a به کلروفیل b و شاخص نسبی کلروفیل (RCM) به‌ترتیب به مقدار 9/8، 18/6 میلی‌گرم بر گرم، 6/5 میلی‌گرم بر گرم، 0/096 میلی‌گرم بر گرم، 25/3 میلی‌گرم بر گرم، 2/81 و 1/1 از مصرف به‌ترتیب 72، 72، 70، 83، 75، 70 و 61 کیلوگرم نیتروژن در هکتار و حداقل مقدار کاراتنوئیدها به مقدار 0/32 میلی‌گرم بر گرم از مصرف 71 کیلوگرم نیتروژن در هکتار به‌دست آمد (جدول 7). بنابراین به‌طور متوسط مصرف 72 کیلوگرم نیتروژن در هکتار توانست ایده‌آل‌ترین شرایط را از لحاظ پارامترهای کلروفیل در گیاه در شرایط آزمایش مهیا نماید که مطابق با قانون بازده نزولی میچرلیخ، توصیه مقدار کود مورد نیاز برای دستیابی به نقطه ماکزیمم اقتصادی نیست. ساویر و همکاران (Sawyer *et al*., 2004) توصیه کرده‌اند، حد بهینه قابل دسترس و مقادیر نیتروژن مورد نیاز بر حسب تفاوت از حد بهینه اقتصادی نیتروژن (ND) که قابل دسترس و واقعی‌تر از حداکثر مقدار رشد می‌باشد، محاسبه و توصیه شود. بر این اساس، مقادیر بهینه پارامترهای شاخص کلروفیل (SPAD)، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل c، کلروفیل کل، نسبت کلروفیل a به کلروفیل b و شاخص نسبی کلروفیل (RCM) در حد بهینه اقتصادی مصرف نیتروژن (جدول 5) به‌ترتیب 9/4، 16/6 میلی‌گرم بر گرم، 5/9 میلی‌گرم بر گرم، 0/077 میلی‌گرم بر گرم، 23/9 میلی‌گرم بر گرم، 2/78 و 1/0 بود. مقایسه این اعداد با نتایج به‌دست آمده از تیمار N_{60} (جدول 6) نشان داد که این مقادیر کمتر از مقادیر مربوط به تیمار N_{60} می‌باشند و حد بهینه اقتصادی مصرف نیتروژن برای گندم دیم نیز کمتر از تیمار N_{60} است.

با مصرف نیتروژن میزان شاخص کلروفیل (SPAD) و به دنبال آن میزان کلروفیل و اجزای آن به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول 6). معمولاً در گیاهان دچار کمبود نیتروژن مصرف نیتروژن می‌تواند میزان کلروفیل و کارایی آن را به‌ویژه در شرایط تنش آبی در استفاده از نور افزایش داده و موجب افزایش فعالیت چرخه فتوسنتز گیاه و تولید بیشتر ماده خشک نماید که نتایج به‌دست آمده از پژوهش‌های مختلف این موضوع را به اثبات می‌رساند (Li *et al*., 2012; Zivcak *et al*., 2014). بر این اساس در پژوهش حاضر نیز با افزایش میزان مصرف نیتروژن، شاخص کلروفیل (SPAD) افزایش یافت و به دنبال آن عملکرد دانه گندم دیم به‌طور معنی‌داری و به‌صورت خطی افزایش یافت (شکل 3الف). بنابراین، افزایش شاخص کلروفیل و اجزای آن یکی از صفات مهم در دستیابی به عملکردهای مطلوب در شرایط دیم به‌شمار می‌آید که تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله مدیریت مصرف نیتروژن می‌باشد. وجود چنین ارتباطی بین میزان کلروفیل در گیاه با عملکرد دانه مورد تأیید بسیاری از پژوهش‌گران بوده است (Redillas *et al*., 2011; Shah *et al*., 2017).

جدول 6- مقایسه میانگین پارامترهای کلروفیل در برگ برای سطوح مصرف نیتروژن

Table 6- Mean comparison for chlorophyll components in leaf for nitrogen application rates

نیتروژن Nitrogen ($kg.ha^{-1}$)	شاخص کلروفیل SPAD	کلروفیلa Chl. a (mg/g fresh leaf)	کلروفیلb Chl. b (mg/g fresh leaf)	کلروفیل کل Total chl. (mg/g fresh leaf)	کاراتنوئیدها Carotenoids (mg/g fresh leaf)	کلروفیلc Chl. c (mg/g fresh leaf)	کلروفیلb/کلروفیلa Chl a/Chl b	شاخص نسبی کلروفیلمتر RCM	شاخص نیتروژن Nitrogen index
0	6.7	11.4	4.1	15.8	0.58	0.033	2.72	0.72	100
30	8.8	16.3	5.8	22.0	0.39	0.073	2.79	0.97	143
60	9.7	18.5	6.6	24.8	0.34	0.087	2.80	1.07	160
90	9.8	18.5	6.6	24.9	0.32	0.094	2.80	1.00	197
LSD 5%	0.8	1.9	0.7	2.4	0.08	0.013	0.03	0.10	33

جدول 7- روابط رگرسیونی بین میزان نیتروژن مصرفی (کیلوگرم در هکتار) با پارامترهای کلروفیل در برگ

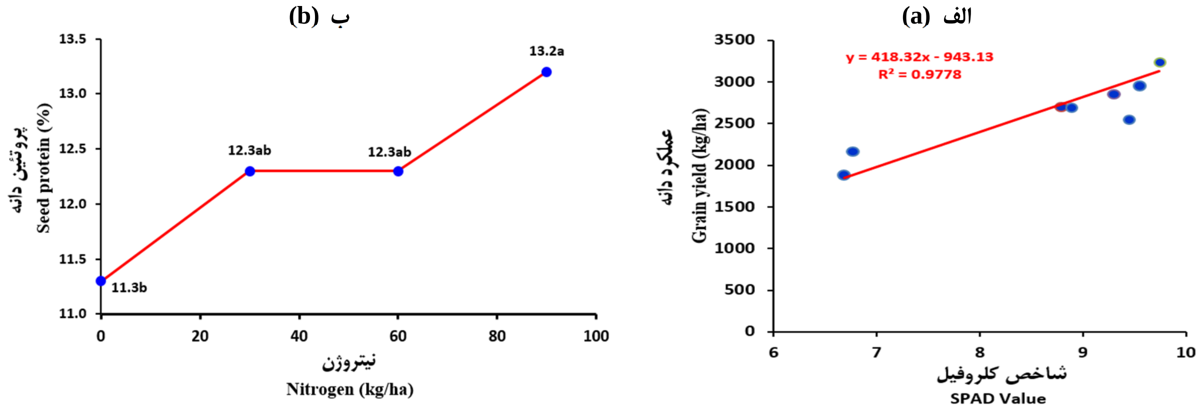
Table 7- Regression equations between nitrogen application rates ($kg.ha^{-1}$) and leaf chlorophyll components

پارامتر	Parameter	Regression equation معادله رگرسیونی	انحراف استاندارد (SE)	ضریب تبیین (R^2)
شاخص کلروفیل	SPAD	$SPAD = -0.0006N^2 + 0.0863N + 6.6902$	0.098	1.00**
کلروفیلa (mg/g fresh leaf)	Chl. a	$Chl.\ a = -0.0014N^2 + 0.2011N + 11.372$	0.011	1.00**
کلروفیلb (mg/g fresh leaf)	Chl. b	$Chl.\ b = -0.0005N^2 + 0.0689N + 4.1309$	0.022	1.00**
کلروفیلc (mg/g fresh leaf)	Chl. c	$Chl.\ c = -9*10^{-6}N^2 + 0.0015N + 0.0334$	0.004	0.99**
کلروفیل کل (mg/g fresh leaf)	Total Chl. b	$Total\ Chl = -0.0017N^2 + 0.2544N + 15.821$	0.016	1.00**
کاراتنوئیدها (mg/g fresh leaf)	Carotenoids	$Carotenoids = 5*10^{-5}N^2 - 0.0071N + 0.5742$	0.024	0.99**
نسبت کلروفیلa به b	Chl a/Chl b	$Chl.\ a/\ Chl.\ b = -2*10^{-5}N^2 + 0.0028N + 2.7164$	0.011	0.99**
شاخص نسبی کلروفیل	RCM	$RCM = -9*10^{-5}N^2 + 0.0109N + 0.7231$	0.004	1.00**
شاخص نیتروژن	Nitrogen index	$NI = 1.0217N + 103.85$	7.576	0.98*

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال 5 ٪ و 1%

* & **: Significant at 5% and 1% probability levels respectively.

مصرف نیتروژن افزون بر میزان کلروفیل و اجزای آن، میزان پروتئین دانه را نیز به‌طور معنی‌داری افزایش داد (شکل 3ب). در تیمارهای N_{30} و N_{60} افزایش یک واحدی پروتئین در مقایسه با تیمار شاهد (N_0) دیده شد، به‌طوری که این دو تیمار مصرف نیتروژن فوق از لحاظ آماری در کلاس مشابه قرار گرفتند و نسبت به دو تیمار شاهد و N_{90} تفاوت معنی‌داری نداشتند. کاربرد تیمار N_{90} مقدار پروتئین دانه را 0/9 واحد نسبت به تیمار N_{30} و N_{60} و 1/9 واحد نسبت به تیمار N_0 افزایش داد که تنها با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری داشت. مطابق این نتایج، اگرچه کاربرد نیتروژن در محدوده نیاز نیتروژنی گندم دیم (60-50 کیلوگرم در هکتار) می‌تواند میزان پروتئین دانه را افزایش دهد، اما این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نخواهد بود. با مصرف مقادیر بیشتر نیتروژن (بیش از 60 کیلوگرم در هکتار) امکان افزایش معنی‌دار پروتئین دانه وجود دارد. کوئینگ و همکاران (Koenig *et al*., 2011) با انجام پژوهش دو ساله‌ای در سه نقطه شرق ایالت واشینگتن با متوسط بارندگی سالیانه 196 تا 510 میلی‌متر روی ژنوتیپ‌های مختلف گندم دیم گزارش کردند که با افزایش مقدار نیتروژن مصرفی عملکرد دانه و میزان پروتئین دانه افزایش یافت، اما در سطوح نهایی مصرف نیتروژن (125 کیلوگرم نیتروژن در هکتار) در برخی مناطق عملکرد دانه سیر نزولی داشت، این در حالی است که میزان پروتئین دانه همچنان به‌صورت خطی افزایش یافت. نتایج مشابهی توسط هاگینس و همکاران (Huggins *et al*., 1989)، فیز و همکاران (Fiez *et al*., 1994)، گای و گاریو (Guy and Gareau, 1998) و بوتلر (Buteler, 2008) برای گندم دیم گزارش شده است. بریسز (Berecz, 2001) معتقد است، از بین سه عنصر غذایی نیتروژن، فسفر و پتاسیم، اثر نیتروژن بر ویژگی‌های گیاهی و اجزای عملکرد دانه گندم در شرایط دیم بیشتر است و تأمین نیتروژن به اندازه کافی برای گندم دیم اهمیت زیادی در تولید میزان پروتئین و کیفیت دانه دارد. نتایج این پژوهش‌گران در خصوص افزایش عملکرد دانه و غلظت پروتئین دانه با مصرف نیتروژن، با نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر کاملاً مطابقت دارد.



شکل 3- رابطه بین شاخص نسبی کلروفیل و عملکرد دانه (الف) و میزان مصرف نیتروژن و پروتئین دانه (ب)

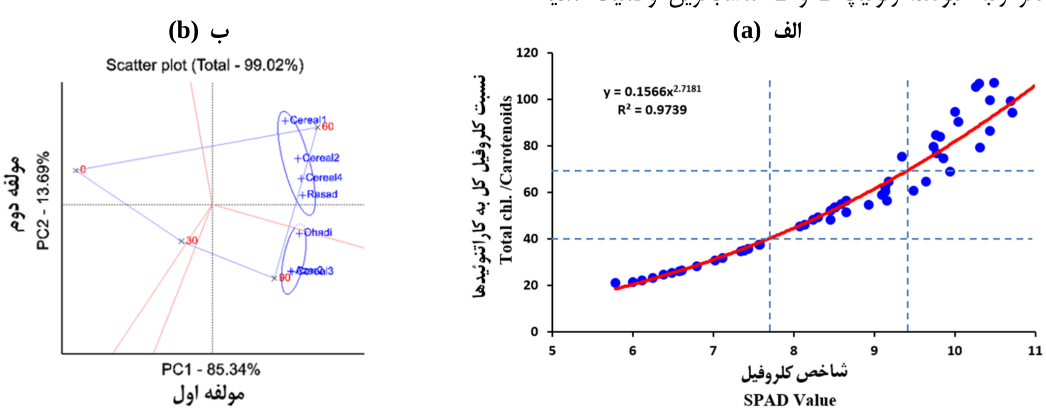
Figure 3- Relationship between SPAD values with grain yield (a) and nitrogen rate with seed protein content (b)

مقایسه میانگین پارامترهای کلروفیل در گیاه برای ژنوتیپ‌های مورد بررسی نشان داد، بین ژنوتیپ‌ها از لحاظ شاخص کلروفیل (SPAD)، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کاراتنوئیدها، کلروفیل c و نسبت کلروفیل a به کلروفیل b و از لحاظ شاخص نسبی کلروفیل (RCM) تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول 8). بیشترین مقدار شاخص کلروفیل (SPAD)، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کلروفیل c و نسبت کلروفیل a به کلروفیل b و شاخص نسبی کلروفیل (RCM) به ژنوتیپ ژنوتیپ1 اختصاص داشت. رقم فوق در پارامتر شاخص نسبی کلروفیل (RCM) با رقم اوحدی در یک گروه آماری قرار گرفتند. حداقل پارامترهای یادشده به رقم آذر2 اختصاص یافت که در صفت نسبت کلروفیل a به کلروفیل b با رقم اوحدی کلاس مشابهی داشت. برعکس پارامترهای کلروفیل و اجزای آن در خصوص میزان کاراتنوئیدها بیشترین مقدار به رقم آذر2 و اوحدی و کمترین آن به ژنوتیپ1 اختصاص یافت. در پژوهش‌های سایرین نیز از لحاظ میزان کلروفیل در گیاه تفاوت‌هایی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مشاهده شده است. در گندم نان و دوروم تفاوت‌های بین شاخص کلروفیل (SPAD) در ژنوتیپ‌های مختلف بیشتر به تفاوت در مقادیر کلروفیل در برگ و همچنین ضخامت پهنک برگ ارتباط داده شده است (Giunta *et al*., 2002; Hoel, 2002)، اما در ذرت این تفاوت بیشتر با نوع واریته، مرحله رشد و عملیات مزرعه‌ای انجام گرفته مرتبط بوده است (Schepers *et al*., 1992). میزان کلروفیل در گندم به‌عنوان شاخص ارزیابی منابع ژنتیکی این محصول شناخته شده است (Herzog, 1986)، بر این اساس، کاهش میزان کلروفیل گیاه نشانگر فاکتور محدودیت غیرروزنه‌ای فتوسنتز در شرایط تنش رطوبتی می‌باشد. در واقع میزان کلروفیل بیشتر، سالم بودن غشای تیلاکوئید و کارایی نسبی انتقال الکترون را از فتوسیستمII به فتوسیستمI نشان می‌دهد. بنابراین با توجه به محتوی کلروفیل می‌توان ژنوتیپ‌های مقاوم به تنش‌های رطوبتی و دمایی را تفکیک نمود. در این خصوص ژنوتیپ‌های دارای کلروفیل بیشتر مقاومت بالایی به تنش‌های رطوبتی و دمایی دارند (Keyvan, 2010). در خصوص گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس محتوی کلروفیل آنها توصیه شده است، بیشتر از نسبت کلروفیل کل به کاراتنوئیدها و یا نسبت کلروفیل a به کلروفیل b استفاده شود که این دو عامل بهتر می‌توانند ماهیت ژنوتیپ‌ها و شرایط محیطی رشد آنها را به تصویر بکشانند، زیراکه در شرایط تنش، این پارامترها در گیاه به شدت تحت تاثیر قرار گرفته و تغییر پیدا می‌کنند (Richardson *et al*., 2002; Nascimento and Marenco, 2010). بریتو و همکاران (Brito *et al*., 2011) از بین این دو شاخص، نسبت کلروفیل کل به کاراتنوئیدها را مناسب‌ترین شاخص برای تشخیص شرایط تنش و غیرتنش در گیاه و تنش‌های اکسیداتیو و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها معرفی نمودند. رابطه بین شاخص کلروفیل با نسبت کلروفیل کل به کاراتنوئیدها از نوع نمایی بود که تغییرات شاخص کلروفیل توانست 96 درصد از تغییرات نسبت کلروفیل کل به کاراتنوئیدها را توجیه نماید (شکل 4الف). مطابق این رابطه مقادیر پایین نسبت کلروفیل کل به کاراتنوئیدها شرایط نامناسب را برای تیمارهای آزمایشی و ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد، اما مقادیر بالای آن سالم بودن غشای تیلاکوئیدی و انتقال الکترون از فتوسیستمII به فتوسیستمI را نشان می‌دهد. با استفاده از انحراف معیار نسبت کلروفیل کل به کاراتنوئیدها در میانگین تیمارهای آزمایشی (56 قرائت)، داده‌های مربوطه به سه گروه کم ($<\bar{X}$-SD)، متوسط ($\bar{X}$-SD to $\bar{X}$+SD) و زیاد ($>\bar{X}$+SD) تقسیم شدند (Feiziasl *et al*., 2016). نسبت کلروفیل کل به کاراتنوئیدها کمتر از 40 به ناحیه کم، 70-40 به ناحیه مناسب و بیش از 70 به ناحیه زیاد کلروفیل تفکیک شد. در نتیجه، مطابق این تقسیم‌بندی مقادیر کمتر از 7/7

شاخص کلروفیل (SPAD) به ناحیه کمبود کلروفیل و حساس به شرایط تنش، 9/5-7/7 به ناحیه مناسب و بیش از 9/5 به ناحیه زیاد کلروفیل و مقاوم به شرایط تنش رطوبتی و دمایی تقسیم شد (شکل 4الف). بر این اساس، رقم آذر2 در ناحیه کمبود و حساس به شرایط تنش رطوبتی و دمایی، سایر ژنوتیپ‌ها به استثنای ژنوتیپ1 در گروه مناسب و ژنوتیپ1 در گروه زیاد کلروفیل و مقاوم به تنش‌های اکسیداتیو قرار گرفت (جدول 8). افزون بر این، برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در سطوح مصرف نیتروژن برای پارامتر نسبت کلروفیل کل به کاراتنوئیدها به‌عنوان مناسب‌ترین شاخص برای تفکیک تیمارهای مقاوم به تنش‌های اکسیداتیو از روش بای پلات استفاده شد (شکل 4ب). در این روش، بیشترین مقادیر این پارامتر در ژنوتیپ‌ها از مصرف دو تیمار N_{60} و N_{90} به‌دست آمد و سایر تیمارها (N_0 و N_{30}) در تولید حداکثر نسبت کلروفیل کل به کاراتنوئیدها در گیاه بی‌تاثیر بودند. ژنوتیپ‌های شماره 1، 2 و 4 و رصد بیشترین نسبت کلروفیل کل به کاراتنوئیدها را از مصرف 60 کیلوگرم نیتروژن در هکتار داشتند که در این میان ترتیب بیشترین این مقدار در ژنوتیپ‌های1 و 2 (تقریباً مشابه)، 4 و رصد بود. این در حالی است که سه ژنوتیپ دیگر شامل آذر2، اوحدی و ژنوتیپ3 بیشترین این پارامتر را در مصرف 90 کیلوگرم نیتروژن در هکتار داشتند و از این لحاظ ژنوتیپ آذر2 و ژنوتیپ3 وضعیت مشابهی قرار گرفتند و برتر از رقم اوحدی بودند. از نتایج یادشده استنباط می‌شود، رقم آذر2 و ژنوتیپ3 با رتبه بیشتری در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها حساس به کمبود نیتروژن و مقاومت آنها نسبت به تنش‌های رطوبتی، دمایی و یا تنش‌های اکسیداتیو پایین می‌باشد که در این خصوص رقم اوحدی در اولویت بعدی قرار دارد (شکل 4ب)، زیراکه این ژنوتیپ‌ها بیشترین مقدار کلروفیل کل به کاراتنوئیدها را با مصرف مقدار بالاتر از نیاز نیتروژنی خود (N_{90}) به‌دست آوردند (جدول 8) و در مقادیر نزدیک به نیاز نیتروژنی و کمتر از آن حائز رتبه نبودند. ژنوتیپ 1 و 2 مناسب‌ترین وضعیت تغذیه نیتروژنی را در شرایط آزمایش داشتند و از این لحاظ ژنوتیپ4 و رصد نیز وضعیت مطلوبی را نشان دادند. در مطالعه شمسی‌پور و همکاران (Shamsipour *et al.*, 2010) ژنوتیپ‌های مورد مطالعه گندم از لحاظ محتوی کلروفیل و مقاومت به تنش‌های اکسیداتیو در سه گروه قرار گرفتند و بین ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری وجود داشت. برخی نیز همانند روش بای پلات از طریق نسبت کلروفیل a به کلروفیل b، مجموع کلروفیل a و کلروفیل b و یا نسبت کلروفیل کل به کاراتنوئیدها، ژنوتیپ‌ها را به دو گروه مقاوم و حساس گروه‌بندی کرده‌اند که در پژوهش آنها نیز تفاوت محتوی شاخص‌های کلروفیل در بین ژنوتیپ‌ها مورد تأیید بوده است و همانند نتایج پژوهش حاضر به‌عنوان معیاری در شناسایی ارقام مقاوم به تنش‌ها از آن استفاده شده است (Sairam and Siravastav, 2002; Keyvan, 2010).

مقایسه میانگین برای پارامترهای کلروفیل در مراحل مختلف رشد گندم دیم نشان داد، بین تمامی پارامترهای مورد بررسی در مراحل مختلف رشد تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول 9). به‌تعبیر دیگر، یکی از عوامل موثر در ویژگی‌های مربوط به کلروفیل گیاه تغییر فصل و مرحله رشد این گیاه می‌باشد. بیشترین مقدار شاخص کلروفیل (SPAD) در مرحله پنجه کامل (GS29) به‌دست آمد که با مراحل طویل شدن ساقه با ظهور دو گره کامل (GS32) و ظهور برگ پرچم (GS39) در کلاس مشابه A قرار گرفتند. حداقل مقدار این پارامتر به دو مرحله ظهور دو پنجه کامل (GS22) و گلدهی (GS60) اختصاص داشت. تغییرات و کلاس‌بندی مشابهی با شاخص کلروفیل (SPAD) برای پارامترهای کلروفیلa، کلروفیلb و کلروفیل کل مشاهده گردید.

مطابق این نتایج، از اواخر مرحله پنجه‌زنی پارامترهای یادشده در گیاه افزایش یافت و تا شروع رشد زایشی گیاه (ظهور برگ پرچم) وضعیت تقریباً یکنواختی را داشتند، اما در مرحله رشد زایشی به‌طور متوسط 21 درصد این پارامترها کاهش یافتند.



شکل 4- رابطه بین شاخص کلروفیل با نسبت کلروفیل به کاراتنوئیدها (الف) و بای پلات ژنوتیپ در نیتروژن برای نسبت کلروفیل به کاراتنوئیدها (ب)

Figure 4- Relationship between SPAD values with total chlorophyll per carotenoids ratio (a) and genotype × nitrogen interaction by biplot for total chlorophyll per carotenoids ratio (b)

جدول 8- مقایسه میانگین پارامترهای کلروفیل برگ در سطوح ژنوتیپ‌ها
Table 8- Mean comparison of leaf chlorophyll components for genotypes

ژنوتیپ Genotype		شاخص کلروفیل SPAD	کلروفیلa Chl. a	کلروفیلb Chl. b	کلروفیل کل Total chl.	کاراتنوئیدها Carotenoids	کلروفیلc Chl. c	کلروفیلa/کلروفیلb Chl a/Chl b	شاخص نسبی کلروفیل‌متر RCM	شاخص نیتروژن Nitrogen index
			(mg/g fresh leaf)							
Azar2	آذر2	7.6	13.5	4.8	18.5	0.49	0.048	2.75	0.94	147
Ohadi	اوحدی	8.2	14.8	5.3	20.2	0.46	0.065	2.75	0.93	148
Rasad	رصد	8.9	16.4	5.9	22.2	0.40	0.077	2.77	0.98	154
Genotype1	ژنوتیپ1	9.9	18.9	6.7	25.4	0.31	0.092	2.80	0.98	152
Genotype2	ژنوتیپ2	9.1	16.9	6.0	22.8	0.39	0.076	2.79	0.94	148
Genotype3	ژنوتیپ3	8.9	16.5	5.9	22.4	0.39	0.075	2.78	0.92	148
Genotype4	ژنوتیپ4	8.7	16.0	5.7	21.7	0.40	0.069	2.78	0.89	151
LSD5%		0.6	1.3	0.5	1.7	0.05	0.013	0.02	0.06	13

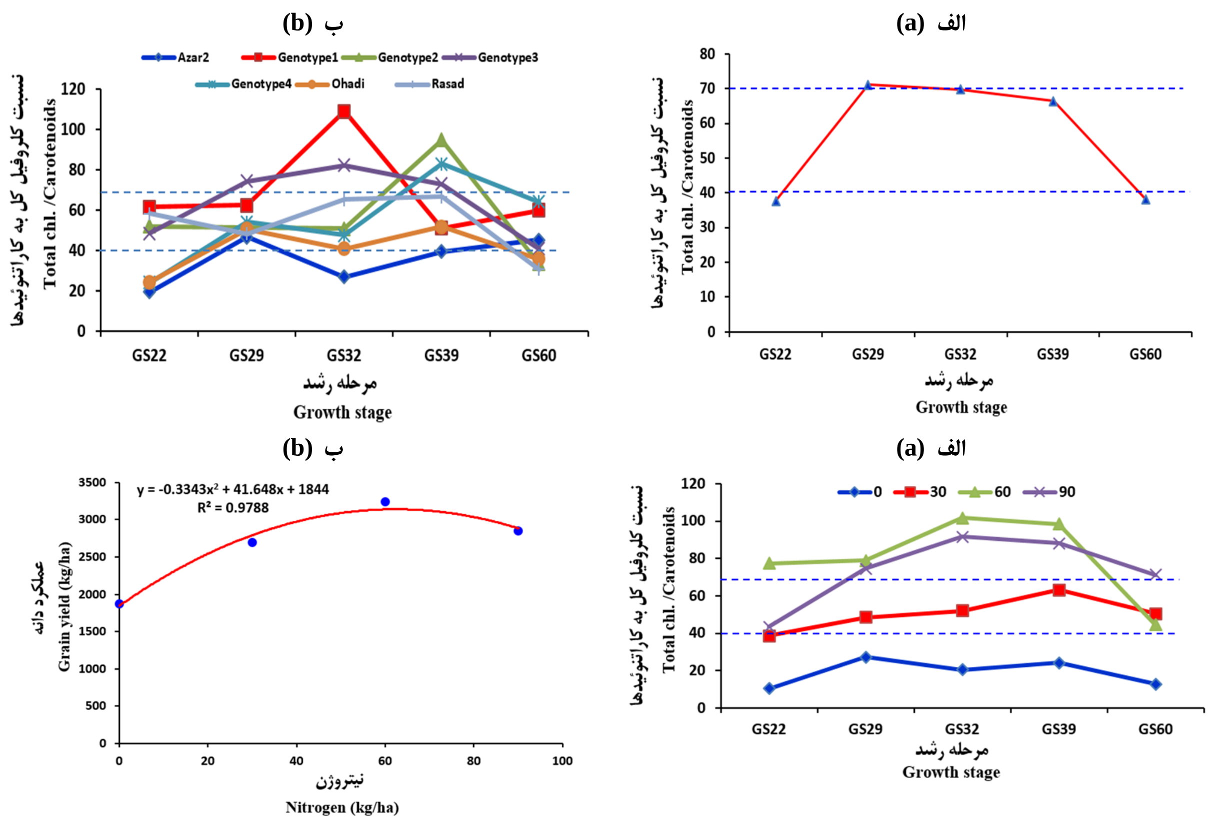
مقدار کاراتنوئیدها برعکس پارامترهای یادشده وضعیت متفاوتی داشت. بدین ترتیب بیشترین آن در مراحل ابتدای (ظهور دو پنجه) و انتهای (گلدهی) اندازه‌گیری با کلاس A و کمترین آن در بخش میانی (پنجه کامل، ساقه با دو گره کامل و ظهور برگ پرچم) با کلاس B مشاهده گردید. بیشترین مقدار کلروفیلc از مرحله ظهور برگ پرچم (GS39) و کمترین آن به‌طور مشترک از مراحل ساقه با دو پنجه کامل (GS22) و گلدهی (GS60) به‌دست آمد. نسبت کلروفیلa به کلروفیلb تا حدودی وضعیت مشابهی با پارامترهای شاخص کلروفیل (SPAD)، کلروفیلa، کلروفیلb و کلروفیل کل داشت، با این تفاوت که مرحله ظهور برگ پرچم (GS39) همکلاس با مراحل پنجه کامل (GS29) و طویل شدن ساقه با دو گره کامل (GS32) نبود و به جای کلاس برتر A در کلاس B قرار گرفت. برای شاخص نسبی کلروفیل (RCM) بیشترین مقدار از مرحله ظهور برگ پرچم (GS39) با کلاس A و کمترین آن از مرحله ساقه با دو پنجه کامل (GS22) به‌دست آمد و سایر مراحل وضعیت مشابهی داشتند و در کلاس B قرار گرفتند. شمسی‌پور و همکاران (Shamsipour *et al*., 2010) با بررسی 10 ژنوتیپ گندم در شرایط تنش رطوبتی گزارش کردند، در مرحله زایشی گندم شاخص کلروفیل (SPAD) با مراحل رشد سیر نزولی داشت. دبیک و همکاران (Debaeke *et al*., 2006) نیز با بررسی ژنوتیپ‌های گندم دوروم گزارش کردند، شاخص کلروفیل در برگ با طول دوره رشد در تیمارهای مختلف مصرف نیتروژن از مرحله ساقه رفتن سیر نزولی یافت و در نهایت به وضعیت ثابتی رسید. آنها نتیجه گرفتند که از شاخص کلروفیل (SPAD) به تنهایی نمی‌توان در تشخیص وضعیت نیتروژن در گیاه و توصیه تیمار نیتروژنی استفاده نمود، مگر اینکه این شاخص از طریق منحنی رقت نیتروژن همانند روش NSI نرمال گردد. ریس و همکاران (Reis *et al*., 2009) تغییرات شاخص کلروفیل (SPAD)، کلروفیلa، کلروفیلb و کلروفیل کل را در سطوح مختلف مصرف نیتروژن در طول دوره رشد قهوه مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که با زمان رشد تمامی پارامترهای یادشده سیر نزولی دارند و با گذشت زمان به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند. آنها علت این کاهش را خروج برگ‌های پیر و قدیمی از چرخه فعال فتوسنتز و شرکت آنها در مکانیسم انتقال مجدد عنوان نمودند. مقایسه نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر با نتایج سایرین کاهش شاخص کلروفیل (SPAD)، کلروفیلa، کلروفیلb و کلروفیل کل را از مرحله پنجه کامل (GS29) تا رسیدگی فیزیولوژیک کاملاً تأیید می‌نماید و مغایرتی با پژوهش‌های شمسی‌پور و همکاران (Shamsipour *et al*., 2010) و دبیک و همکاران (Debaeke *et al*., 2006) ندارد.

به‌منظور تشخیص وضعیت تغذیه‌ای گیاه در مراحل مختلف رشد از تغییرات شاخص نسبت کلروفیل به کاراتنوئیدها در این دوره استفاده شد (شکل 5الف). بر این اساس، گندم دیم در دو مرحله ظهور دو پنجه کامل (GS22) و گلدهی (GS60) به دلیل پایین بودن این شاخص (کمتر از 40) تا حدودی با مشکل تغذیه نیتروژنی مواجه بوده است. اما در مرحله طویل شدن ساقه با ظهور دو گره کامل (GS32)، گیاه کاملاً در شرایط مطلوبی قرار داشته است. در دو مرحله پنجه کامل (GS29) و ظهور برگ پرچم (GS39) شرایط تغذیه‌ای گیاه هم مرز با شرایط مطلوب و زیاد نیتروژن بود. از نتایج یادشده استنباط می‌شود، به غیر از دو مرحله اوایل پنجه‌زنی (GS22) و گلدهی (GS60) گندم دیم از لحاظ تغذیه نیتروژنی با مشکل مواجه نبوده و شرایط مطلوب فتوسنتز و تولید در آن به خوبی انجام گرفته است.

جدول 9- مقایسه میانگین پارامترهای کلروفیل در برگ برای مراحل مختلف رشد گیاه

Table 9- Mean comparison for chlorophyll components in leaf for difference growth stages

مرحله رشد Growth stage	شاخص کلروفیل SPAD	کلروفیلa Chl. a	کلروفیلb Chl. b	کلروفیل کل Total chl.	کاراتنوئیدها Carotenoids	کلروفیلc Chl. c	کلروفیلa/کلروفیلb Chl a/Chl b	شاخص نسبی کلروفیل‌متر RCM	شاخص نیتروژن Nitrogen index
		(mg/g fresh leaf)							
GS22	7.7	13.7	4.9	18.8	0.50	0.056	2.75	0.95	190
GS29	9.5	17.9	6.4	24.1	0.34	0.079	2.80	0.91	120
GS32	9.4	17.7	6.3	23.8	0.34	0.077	2.80	0.85	136
GS39	9.4	17.6	6.3	23.7	0.36	0.088	2.78	1.01	155
GS60	7.7	13.8	5.0	18.9	0.50	0.058	2.75	0.97	148
LSD5%	0.4	1.0	0.4	1.3	0.04	0.009	0.02	0.06	15



شکل 5- تغییرات نسبت کلروفیل به کاراتنوئیدها در مراحل مختلف رشد (الف)، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در مراحل مختلف رشد (ب)، اثرات متقابل نیتروژن در مراحل رشد (ج) و عملکرد دانه در مقادیر مختلف مصرف نیتروژن (د) گندم دیم

Figure 5- Variation of total chlorophyll per carotenoids ratio (a), genotypes (b) and nitrogen rates (c) in dryland wheat growth stages and relationship between nitrogen rate with grain yield (d)

بررسی وضعیت ژنوتیپ‌ها در مراحل مختلف رشد از لحاظ صفت نسبت کلروفیل کل به کاراتنوئیدها نشان داد (شکل 5ب)، رقم آذر2 در سه مرحله ظهور دو پنجه کامل (GS22)، طویل شدن ساقه (GS32) و ظهور برگ پرچم (GS39) در ناحیه کمبود نیتروژن قرار گرفت و در دو مرحله دیگر، با خط مرزی بین ناحیه کمبود و کفایت فاصله زیادی نداشت. ژنوتیپ‌های اوحدی و ژنوتیپ4 در مرحله اول و ژنوتیپ‌های اوحدی، رصد و ژنوتیپ2 در مرحله نهایی رشد از لحاظ تغذیه نیتروژنی و فتوسنتز در ناحیه کمبود قرار گرفتند. با توجه به

اینکه رقم آذر2 در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه روشن‌ترین رنگ برگ را در مقادیر مختلف مصرف نیتروژن دارد، لذا صحت نتایج یادشده را به خوبی تأیید می‌نماید. ژنوتیپ1 در هیچ‌کدام از مراحل رشد در ناحیه کمبود قرار نگرفت. در بین ارقام موجود در پژوهش رقم رصد مناسب‌ترین وضعیت را از لحاظ تغذیه نیتروژنی داشت و در بین چهار ژنوتیپ دیگر ژنوتیپ‌های 1 و 2 وضعیت مطلوبی را در تمامی مراحل رشد داشتند.

تغییرات نسبت کلروفیل کل به کاراتنوئیدها در سطوح مصرف نیتروژن نیز در مراحل مختلف رشد نشان داد (شکل 5ج)، تیمار N_0 در تمامی مراحل رشد در وضعیت کمبود نیتروژن قرار گرفت و تغییرات زیادی در این مراحل نداشت. تیمار N_{30} در تمامی مراحل به استثنای مرحله اول در ناحیه کفایت قرار گرفت و به تدریج از مرحله ظهور دو پنجه (GS22)، طویل شدن ساقه (GS32) تا ظهور برگ پرچم (GS39) مقدار نسبت نسبت کلروفیل کل به کاراتنوئیدها در آن افزایش و در مرحله نهایی گلدهی (GS60) مقداری کاهش یافت. البته این تیمار در مرحله اول رشد یا ظهور دو پنجه (GS22) هم مرز با ناحیه کمبود قرار گرفت. در تیمار N_{60} چهار مرحله اولیه رشد در ناحیه زیاد بود و ناحیه پنجم در ناحیه کمبود قرار گرفت. این در حالی است که در تیمار N_{90} مرحله اولیه در ناحیه کفایت و چهار مرحله نهایی در ناحیه زیادبود نیتروژن قرار گرفت. مطابق این نتایج، اولاً تیمار بدون مصرف نیتروژن (N_0) وضعیت تغذیه نیتروژنی نامناسب داشت. ثانیاً تیمار N_{60} از لحاظ تغذیه نیتروژنی در اغلب موارد بالاتر از تیمار N_{90} قرار گرفت و مطلوب‌ترین شرایط را داشت، به‌ویژه اینکه تغذیه نیتروژنی در شرایط دیم در مراحل اولیه رشد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و تولید ماده خشک و عملکرد دانه مناسب از طریق مکانیسم انتقال مجدد در دوره زایشی گیاه به تغذیه مطلوب در مراحل رویشی و قبل از ظهور سنبله بستگی دارد (Anderson and Impiglia, 2002). با استناد بر مطالب یادشده و اقتصاد مصرف کود استنباط می‌شود، تیمار N_{60} از تیمار N_{90} برای چنین شرایطی مطلوب‌تر و قابل توصیه‌تر باشد. از سوی دیگر، نتایج تحقیقات نشان می‌دهد، غلظت نیتروژن در گیاه در مرحله گلدهی همبستگی بالایی با تولید عملکرد دانه دارد و تیمارها و یا ارقامی که در این مرحله قادر باشند نیتروژن بالایی را در اندام‌های رویشی خود تجمع نمایند در شرایط تنش رطوبتی عملکردهای مطلوبی را تولید می‌نمایند (Abbate *et al*., 1995). این مطالب، نتایج پژوهش حاضر را در خصوص تولید بالاترین عملکرد دانه (3237 کیلوگرم در هکتار در کلاس A) در تیمار N_{60} در مقایسه با تیمار N_{90} با عملکرد 2853 کیلوگرم در هکتار کاملاً تأیید می‌نماید (شکل 5د).

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد، پاسخ ارقام مختلف گندم دیم به مصرف نیتروژن متفاوت بود و از لحاظ محتوی کلروفیل و اجزای آن نیز بین ارقام اختلاف وجود داشت. با استفاده از کلروفیل‌متر می‌توان میزان واقعی کلروفیل و اجزای آن را در ژنوتیپ‌های گندم دیم در مراحل مختلف رشد با دقت بالایی تخمین زد. همچنین از طریق مدیریت میزان و زمان مصرف نیتروژن می‌توان مقادیر کلروفیل و اجزای آن را در گیاه بهبود بخشید. برای تولید حداکثر و حد بهینه اقتصادی گندم دیم به‌ترتیب حدود 20 و 10 کیلوگرم نیتروژن در هکتار کمتر از نیتروژن مورد نیاز برای شرایط ایده‌آل وضعیت کلروفیل و اجزای آن در گیاه لازم است. مقادیر کلروفیلa (16/6 میلی‌گرم بر گرم)، کلروفیلb (5/9 میلی‌گرم بر گرم)، کلروفیلc (0/077 میلی‌گرم بر گرم)، کلروفیل کل (23/9 میلی‌گرم بر گرم) و نسبت کلروفیلa به کلروفیلb (2/78)، شاخص کلروفیل (9/4) و شاخص نسبی کلروفیل (1/0) برای حد بهینه اقتصادی مصرف نیتروژن تعیین گردید.

پیشنهادات

به‌منظور کاربردی نمودن داده‌های حاصل از کلروفیل‌متر در کمک به مدیریت مصرف کودهای نیتروژنی برای گندم دیم پیشنهاد می‌شود، از طریق یک پروژه ملی مدیریت مصرف کودهای نیتروژنی (میزان و زمان مصرف) روابط بین تیمارهای مختلف با نتایج حاصل از کلروفیل‌متر واسنجی و از نتایج حاصله در توصیه کودهای نیتروژنی برای مزارع کشاورزان استفاده شود.

References

1. Abbate, P. E., Andrade, F. H., and Culot, J. P. 1995. The effect of radiation and nitrogen on number of grains in wheat. Journal of Agricultural Science 124: 351-360.
2. Anderson, W. K. and Impiglia, A. 2002. Management of dryland wheat. In: B.C. Curtis, S. Rajaram and H. Gómez Macpherson. Bread wheat Improvement and Production. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
3. Andraski, T. W., Bundy, L. G. and Byre, K. R. 2000. Crop management and corn nitrogen rate effects on nitrate leaching. Journal of Environmental Quality 29:1095-1103.
4. Arnon, D. L. 1949. A copper enzyme is isolated chloroplast polyphenol oxidase in *Beta Vulgaries*. Plant Physiology 24: 1-15.
5. Arshadi, J., and Asgharipour, M. 2011. Effect of nitrogen top-dress management using chlorophyll meter on yield, quality and correlation between some agronomic traits in potato. Advances in Environmental Biology 5 (4): 711-718.
6. Arshadi, M., Khazaee, H., Nassiri Mahallati, M., and Agheli, O. 2016. Evaluation of effects of some important

agronomic traits on potato yield and possibility determining of required time of potato crop to nitrogen fertilizer levels by using chlorophyll meter. Agroecology 2 (1): 119-128. (in Persian with English abstract).
7. Babar, M. A., Reynolds, M., Van Ginkel, M., Klatt, A., Raun, W. R., and Stone, M. L. 2006. Spectral reflectance to estimate genetic variation for in-season biomass, leaf chlorophyll and canopy temperature in wheat. Crop Science 46: 1046-1057.
8. Berecz, K. 2001. Grain yield and quality of winter wheat varieties as affected by different nutrient supply. Plant Nutrition 342-343.
9. Brito, G. G., Sofiatti, V., Brandao, Z. N., Silva, V. B., Silva, F. M., and Silva, D. A. 2011. Non-destructive analysis of photosynthetic pigments in cotton plants. Acta Scientiarum. Agronomy 33 (4): 671-678.
10. Buteler, M. 2008. Integrated management of the wheat stem sawfly by exploiting semiochemicals to enhance trap crops. Ph.D. Thesis, Montana State University. Land Resources and Environmental Sciences. Pages 218.
11. Chunjiang, Z., Aning, J., Wenjiang, H., Keli, L., Liangyun, L., and Jihua W. 2007. Evaluation of variable-rate nitrogen recommendation of winter wheat based on SPAD chlorophyll meter measurement. New Zealand Journal of Agricultural Research 50 (5): 735-741.
12. Coste, S., Baraloto, C., Leroy, C., Marcon, E., Renaud, A., Richardson, A. D., Roggy, J. C., Schimann, H. Uddling, J., and Herault, B. 2010. Assessing foliar chlorophyll contents with the SPAD-502 chlorophyll meter: a calibration test with thirteen tree species of tropical rainforest in French Guiana. Annals of Forest Science 67 (607): 1-5.
13. Debaeke, P., Rouet, P., and Justes, E. 2006. Relationship between the normalized SPAD index and the nitrogen nutrition index: application to durum wheat. Journal of Plant Nutrition 29: 75-92.
14. Esfahani, M., Abbasi, H. R. A., Rabiei, B., and Kavousi M. 2008. Improvement of nitrogen management in rice paddy fields using chlorophyll meter (SPAD). Paddy and Water Environment 6: 181-188.
15. Feibo, W., Lianghuan, W., and Fuhua, X. 1998. Chlorophyll meter to predict nitrogen side dress requirements for short-season cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Field Crops Research 56: 309-314.
16. Feiziasl, V., Fotovat, A., Astarae, A. R., Lakzian, A., and Mousavi, S. B. 2014. Effect of Optimized Nitrogen Application in Reducing Drought Stress Effect on Grain Yield of some Rainfed Bread Wheat Genotypes. Seed and Plant Production Journal 30 (2): 169-198. (in Persian with English abstract).
17. Feiziasl, V., Jafarzadeh, J., Pala, M., and Mosavi, S. B. 2009. Determination of micronutrient critical levels by plant response column order procedure for dryland wheat (*T. aestivum* L.) in Northwest of Iran. International Journal of Soil Science 4 (1): 14-19.
18. Feiziasl, V., Kasraei, R., Moghaddam, M., and Valizadeh, G. R. 2004. Investigation on uptake limitation and nutrient deficiency diagnosis at applied phosphorus and zinc fertilizers by different methods in Sardari wheat. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources 11: 23-33. (in Persian with English abstract).
19. Feiziasl, V., Fotovat, A., Astaraei, A., Lakzian, A., and Mosavi Shalmani, M. 2016. Evaluation of Nitrogen Status in Dryland Wheat Genotypes Using 15N. Iranian Journal of Field Crops Research 15 (3): 494-510. (in Persian with English abstract).
20. Fiez, T. E., Miller, B. C., and Pan, W. L. 1994. Winter wheat yield and grain protein across varied landscape positions. Agronomy Journal. 86: 1026-1032.
21. Follett, R. H., Follett, R. F., and Halvorson, A. D. 1992. Use of a chlorophyll meter to evaluate the nitrogen status of dryland winter wheat. Communications in Soil Science and Plant Analysis 23 (7-8): 687-697.
22. Fowler, D. B. 2002. Nitrogen Fertilization. Winter Cereal Production. Chapter 17. University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada. http://www.usask. Ca / agriculture / cropsci / winter _ cereals. 2014/Jul/27.
23. Fowler, D. B., and Brydon, J. 1989. No-till winter wheat production on the Canadian prairies timing of nitrogen fertilization. Agronomy Journal 81: 817-825.
24. Fowler, D., Brydon, J., and Buker, R. J. 1989. Nitrogen fertilization of no-till winter wheat and rye. II. Influence on grain protein. Agronomy Journal 81: 72-77.
25. Gianquinto, G., and Bona, S. 2000. The significance of trends in concentrations of total nitrogen and nitrogenous compounds. In: A.J. Haverkort and D.K.L. MacKerron (Eds), Management of nitrogen and water in potato production, Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands. pp. 35-55.
26. Gianquinto, G., Sambo, P., and Pimpini, F. 2003. The use of SPAD-502 chlorophyll meter for dynamically optimising the nitrogen supply in potato crop: first results. Acta Horticulture 627: 225-230.
27. Giunta, F., Pruneddu, G., and Motzo, R. 2009. Radiation interception, biomass and nitrogen accumulation in different cereal and grain legume species. Field Crops Research 110: 76-84.
28. Giunta, F., Motzo, R., and Deidda, M. 2002. SPAD readings and associated leaf traits in durum wheat, barley and triticale cultivars. Euphytica 125: 197-205.
29. Groppa, M. D., and Benavides, M. P. 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. Amino Acids 34: 35-45.
30. Guy S. O., and Gareau, R. M. 1998. Crop rotation, residue durability, and nitrogen fertilizer effects on winter wheat production. Journal of Production Agriculture 11 (4): 457-461.

31. Herzog, H. 1986. Source and sink during the reproductive period of wheat: development and its regulation with special reference to cytokinins. Scientific Publication, Berlin and Hamburg.
32. Hirel, B., Le Gouis, J., Ney, B., and Gallais, A. 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: toward a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. Journal of Experimental Botany 58 (9): 2369-2387.
33. Hoel, B. O. 2002. Chlorophyll meter readings in winter wheat: Cultivar differences and prediction of grain protein content. Acta Agriculture Scandinavica, Section B - Soil and Plant Science 52: 147-157.
34. Huggins, D. R., Pan, W. L., and Smith, J. L. 1989. Management considerations for improving yield, percent protein and N use efficiency of dryland hard red spring wheat. STEEP Progress Report, pp. 96-98, Annual STEEP Conference, Portland, OR. January 4-5, 1989.
35. Jeffrey, S. W., and Humphrey, G. F. 1975 New spectrophotometric equations for determining chlorophyll *a, b, c* 1 and *c* 2 in higher plants and natural phytoplankton. Biochemie und Physiologie der Pflanzen (BPP). 165: 191-194.
36. Junior, J. L., Junior, S., and Monteiro, F. A. 2010. Nitrate reeducates activity and SPAD readings in leaf tissues of guinea grass submitted to nitrogen and potassium rates. Revista Brasileira de Ciência do Solo 34 (3): 801-809.
37. Keyvan, S. 2010. The effects of drought stress on yield, relative water content, proline, soluble carbohydrates and chlorophyll of bread wheat cultivars. Journal of Animal and Plant Sciences 8 (3): 1051-1060.
38. Khademi, Z., and Asadi, F. 2013. Estimation of nitrogen fertilizer requirement and corn grain yield using by chlorophyll meter in different growth stages. Iranian Journal of Soil Research 27 (3): 303-315. (in Persian with English abstract).
39. Kizilgeci, F., Akinci, C., Albayrak, O., and Yildirim, M. 2017. Nitrogen effects on SPAD meter and grain yield relationships in F2 durum wheatpopulations. Scientific Journal of Crop Science 6 (5): 176-182.
40. Kizilgeci, F., Yildirim, M., Akinci, C., Albayrak, O., and Basdemir, F. 2015. The Availability of advanced durum wheat population in yield and quality basis selection. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 10 (2): 62-68.
41. Koenig, R. T., Cogger, C. G., and Bary, A. I. 2011. Dryland winter wheat yield, grain protein, and soil nitrogen responses to fertilizer and biosolids applications. Applied and Environmental Soil Science 2011: 1- 9.
42. Koyro, H. W. 2006. Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* L. Environmental and Experimental Botany 56: 136-149.
43. Kucey, R. M. N. 1987. Nitrogen fertilizer application practices for barley production under Southwestern Canadian Prairie conditions. Communications in Soil Science and Plant Analysis 26: 3023-3032.
44. Lemaire, G., van Oosterom, E., Sheehy, J. Jeuffroy, M. H. Massignam, A., and Rossato, L. 2007. Is crop N demand more closely related to dry matter accumulation or leaf area expansion during vegetative growth? Field Crops Research 100: 91-106.
45. Li, J. W., Yang, J. P., Li, D. S., Fei, P. P., Guo, T. T., Geand, C. S., and Chen W. 2011. Chlorophyll meter's estimate of weight-based nitrogen concentration in rice leaf is influenced by leaf thickness. Plant Production Science 14: 177-183.
46. Li, X. H., Han, X. Z., Li, H. B., Song, C., Yan, J., and Liang, Y. 2012. Soil chemical and biological properties affected by 21-year application of composted manure with chemical fertilizers in a Chinese Mollisol. Canadian Journal of Soil Science 92: 419-428.
47. Lichtenthaler, H. K., and Buschmann C. 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, Universitaet Karlsruhe Karlsruhe, Germany.
48. Limon-Ortega, A. 2009. Wheat grain yield response to N application evaluated through canopy reflectance. Cereal Research Communications 37 (4): 595-601.
49. Ma, B. L., Morrison, M. J., and Voldeng, H. D. 1995. Leaf greenness and photosynthetic rates in soybean. Crop Science 35: 1411-1414.
50. Majidi, A. 2014. Use of Minolta SPAD-502 Chlorophyll Meter for Estimating Leaf N Concentration and Grain Protein Content in Three Varieties of Wheat (Text in Persian). Iranian Journal of Soil Research 31 (2): 245-254. (in Persian with English abstract).
51. Malakouti, M. J., and Gheybi, M. N. 2000. Determination of nutrient critical levels in strategic crops and correct fertilizer recommendation in Iran. Agricultural Education Publication, Iran Tehran, pp: 56. (in Persian with English abstract).
52. Mousavi, S., Feizian, M., and Ahmadi A. 2012. Influence of Nitrogen Fertilizer Application Techniques on. Iranian Journal of Field Crops Research 10 (3): 532-545.
53. Nascimento, H. C. S., and Marenco, R. A. 2010. SPAD-502 readings in response to photon fluence in leaves with different chlorophyll content. Revista Ceres 57 (5): 614-620.
54. Peltonen, J., Virtanen. A., and Haggren. E. 1995. Using a chlorophyll meter to optimize nitrogen fertilizer application for intensively-managed small-grain cereals. Journal of Agronomy Crop Science 174: 309-318.

55. Peng, S., Garcia, F. C., Laza, R. C., and Cassman, K. G. 1993. Adjustment for specific leaf weight improves chlorophyll meters estimation of rice leaf nitrogen concentration. Agronomy Journal 85: 987-990.
56. Peterson, T. A., Blackmer, T. M., Francis, D. D., and Schepers J. S. 1993. Using a chlorophyll meter to improve N management. NebGuide G93-1171, Cooperative Extention Service, University of Nebraska, Lincoln.
57. Rafiqul Islam, M., Shamsul Haque, K. M., Akter, N., and Abdul Karim, M. 2014. Leaf chlorophyll dynamics in wheat based on SPAD meter reading and its relationship with grain yield. Scientia Agriculture 8 (1): 13-18.
58. Rasmussen, P. E., Rickman, R. W., and Klepper, B. L. 1997. Residue and fertility effects on yield of no-till wheat. Agronomy Journal 89: 563-67.
59. Redillas, M. C. F. R., Jeong, J. S., Strasser, R. J., Kim, Y. S., and Kim, J. K. 2011. JIP analysis on rice (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) grown under limited nitrogen conditions. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. 54: 827–832.
60. Reis, A.R., Favarin, J.L., Malavolta, E., Junior, J.L. and Moraes, M. F. 2009. Photosynthesis, chlorophylls, and SPAD readings in coffee leaves in relation to nitrogen supply. Communications in Soil Science and Plant Analysis 40: 1512-1528.
61. Richardson, A. D., Duigan, S. P., and Berlyn G. P. 2002. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. New Phytologist 153: 185-194.
62. Sairam, R. K., and Siravastava, G. C. 2002. Changes in antioxidant activity in subcellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. Plant Science 162:897-907.
63. Salehi, M., Koochaki, A., and Nassiri Mahalati, M. 2004. Leaf nitrogen and chlorophyll as indicators for salt stress. Iranian Journal of Field Crops Research 11 (2): 2-10. (in Persian with English abstract).
64. Sawyer, J., Lundvall, J., Hawkins, J., and Barker, D. 2011. Sensing nitrogen stress in corn. Iowa State University, University Extension. Pages 4.
65. Sawyer, J. E., Barker, D. W., and Lundvall, J. P. 2004. Using chlorophyll meter readings to determine N application rates for corn. North Central Extension-Industry Soil Fertility Conference, November 17-18, 2004, Des Moines, IA.
66. Schepers, J. S., Francis, D. D., Vigil, M., and Below, F. E. 1992. Comparison of corn leaf nitrogen concentration and chlorophyll meter readings. Communications in Soil Science and Plant Analysis 23: 2173-2187.
67. Shah, S. H., Houborg, R., and McCabe, M. F. 2017. Response of Chlorophyll, Carotenoid and SPAD-502 Measurement to Salinity and Nutrient Stress in Wheat (*Triticum aestivum* L.). Agronomy 7(61): 2-21.
68. Shamsipour, M., Fotout, R., and Jabari, F. 2010. The relationship between chlorophyll content index grain yield of wheat under drought stress conditions Journal of Crop Ecophysiology 2 (1): 8-16.
69. Spiertz, J. H. J., Vos, N. M. and Holte, L. 1984. The role of nitrogen in yield formation of cereals, especially of winter wheat. p. 49-259. In: E. J. Gallagher (ed.). Cereal production. Royal Dublin Society, Butterworth, UK.
70. Tilling, K., Leary. G. J. O., Ferwerda, J. G., Jones, S. D., Fitzgerald, G. J., Rodriguez, D., and Belford, R. 2007. Remote sensing of nitrogen and water stress in wheat. Field Crops Research 104: 77-85.
71. Torabi B., Soltani, A., Galeshi, S., and Zeinali E. 2011. Analyzing wheat yield constraints in Gorgan. Electronic Journal of Crop Science 4 (4): 1-17.
72. Wang, D., Xu, Z., Zhao. J., Wang. Y., and Yu. Z. 2011. Excessive nitrogen application decreases grain yield and increases nitrogen loss in a wheat-soil system. Acta Agriculture Scandinavica 61: 681-692.
73. Wienhold, B. J., and Krupinsky, J. M. 1999. Chlorophyll meter as nitrogen management tool in malting barley. Communications in Soil Science and Plant Analysis 30: 2551-2562.
74. Yamamoto, A., Nakamura, T., Adu-Gyamfi, J. J., and Saigusa, M. 2002. Relationship between chlorophyll content in leaves of sorghum and pigeon pea determined by extraction method and by chlorophyll meter (SPAD-502). Journal of Plant Nutrition 25: 2295-2301.
75. Yan, W. 2001. GGE biplot–A Windows application for graphical analysis of multi-environment trial data and other types of two-way data. Agronomy Journal. 93: 1111-1118.
76. Zivcak, M., Olsovska, K., Slamka, P., Galambosova, J., Rataj, V., Shao, H. B., and Brestic, M. 2014. Application of chlorophyll fluorescence performance indices to assess the wheat photosynthetic functions influenced by nitrogen deficiency. Plant, Soil and Environment 5: 210-215.

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 17, No. 2, Summer. 2019, p. 221-240

نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد 17، شماره 2، تابستان 1398، ص. 240-221

Determination of Chlorophyll Content and Nitrogen Status Using SPAD in Dryland Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes

V. Feiziasl[1*], A. Fotovat[2], A. Astaraei[3], A. Lakzian[2], J. Jafarzadeh[1]

Received: 25-11-2017
Accepted: 13-11-2018

Introduction

Nitrogen is the most important limiting factor, after water deficit for biomass production in natural ecosystems. Efficient use of nitrogen fertilizer is important to economical dryland wheat production and to the quality of ground and surface waters. Researchers have been looking for ways to increase the efficiency of N fertilizer use. Soil and in-season plant tissue testing for nitrogen status are a time consuming and expensive process. Chlorophyll concentration in a leaf is closely correlated with leaf N concentration so the Soil Plant Analysis Development (SPAD) chlorophyll meter is one of the most commonly used diagnostic tools to measure crop nitrogen status. The SPAD chlorophyll meter is a simple, portable, diagnostic and nondestructive light weight device used to estimate leaf chlorophyll content. Chlorophyll meter techniques provide a substantial saving in time and resources and offer a new strategy for synchronizing nitrogen application with actual crop demand. The objective of this study was to establish and analyze the relationships between measurements from a SPAD instrument and the leaf pigments, as extracted at different stages. The study also seeks to evaluate the utility of a chlorophyll meter to inform nitrogen fertilization rates of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes in dryland condition.

Materials and Methods

This experiment was carried out in split split plot based on RCBD design with three replications. Treatment included: N application time (whole fertilization of N in fall, and its split fertilization as 2/3 in fall and 1/3 in spring), N rates (0, 30, 60 and 90 kg N ha^{-1}) as urea and 7 genotypes (Azar2, Rasad, Ohadi, HN7/OROFEN//BGN8/3/SERI/4/.., SARA-BW-F6-06-85-86-29-1, TEVEE'S'//CROW/VEE'S' and DH-2049-3. A chlorophyll meter (SPAD-Hansatech Cl-01) was used to read leaf chlorophyll content (SPAD value) at tillering (GS22), shooting (29), stem elongation (GS32), flag leaf (GS39) and anthesis stages. Fresh plant leaf samples were collected from each plot for the estimation of chlorophyll a (Chla), chlorophyll b (Chlb), carotenoids (Ct), total chlorophyll (Chlt) and concentrations. The chlorophylls and carotenoids were determined by spectrophotometric analysis of chemically extracted pigments. To examine the relationship between pigments chlorophyll and SPAD values, 30 wheat leaves were sampled. Average Chla, Chlb, Chlt, carotenoids and SPAD values were computed, and linear regression analysis was performed by least-squares method with Excel.

Results and Discussion

The results showed a strong positive and statistically significant ($p<0.01$) relationship between SPAD values and total chlorophyll (R^2 = 0.93), chlorophyll a (R^2 = 0.95), chlorophyll b (R^2 = 0.78) and carotenoids content (R^2 = 0.79). We demonstrated that the SPAD readings and plant photosynthetic pigment content per-leaf are profoundly affected by nitrogen rate and timing of application. Nitrogen split application increased significantly ($p<0.01$) the SPAD values (8.3%), Chla (11.1%), Chlb (10.9%), Chlc (27%), Chlt (15%), (exception of carotenoids) and seed protein content (8.5%). Nitrogen application could affect significantly ($p<0.01$) all chlorophyll indices in plant. The ideal conditions for the chlorophyll indices in the plant were obtained using 72 kg N ha^{-1}. Nitrogen requirement for maximum and optimum economical dryland wheat production is about 20 and 10 kg ha^{-1} less than nitrogen requirement for creation the ideal conditions for chlorophyll status and its components in dryland wheat. Using chlorophyll meter, chlorophyll a (16.6 mg g^{-1}), chlorophyll b (5.9 mg g^{-1}), chlorophyll c (0.077 mg g^{-1}), total chlorophyll (23.9 mg g^{-1}) and chlorophyll a per Chlorophyll b ratio (2.78), chlorophyll index (9.4) and chlorophyll relative index (1.0) were determined in economical optimum N rate (NRD = 0). Genotype1 was most suitable and Azar2 was the most inappropriate condition in terms of

1- Assistant Professor, Dryland Agricultural Research Institute (DARI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Maragheh, Iran
2- Professor, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
3- Associate Professor, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
(*- Corresponding Author Email: vfeiziasl@yahoo.com)

chlorophyll index and total chlorophyll ratio per carotenoids (optimum range 40-70) in the plant as a stress resistance index.

Conclusions

It can be concluded that, the actual chlorophyll content and its components can be estimated using chlorophyll meter (SPAD) in dryland wheat genotypes at different growth stages. Chlorophyll components and seed protein can be improved by nitrogen fertilizer application time and rates in dryland wheat.

Keywords: Chlorophyll components, Biplot method, Economical optimum N rate, Growth stages, Water stress